



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**LEISE SOARES CASTELO BRANCO**

**PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR LINHAGENS DO GÊNERO**  
***Rhodotorula* UTILIZANDO GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO**

**FORTALEZA**

**2015**

**LEISE SOARES CASTELO BRANCO**

**PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR LINHAGENS DO GÊNERO  
*Rhodotorula* UTILIZANDO GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO**

Tese de Doutorado submetida ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Bioquímicos

Orientador: D.Sc. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto

Co-orientadora: D.Sc. Kally Alves de Sousa

**FORTALEZA**

**2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Pós-Graduação em Engenharia - BPGE

---

C345p Castelo Branco, Leise Soares.  
Produção de carotenoides por linhagens do gênero *Rhodotorula* utilizando glicerol como fonte de carbono / Leise Soares Castelo Branco. – 2015.  
106 f. : il. color. enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2015.  
Área de Concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.  
Orientação: Prof. Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto.  
Coorientação: Profa. Dra. Kally Alves de Sousa.

1. Engenharia química. 2. Biodiesel. 3. Biomassa. 4. Fermentação. I. Título.

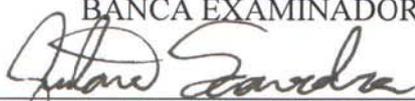
LEISE SOARES CASTELO BRANCO

PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR LINHAGENS DO GÊNERO *Rhodotorula*  
UTILIZANDO GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO

Tese de Doutorado submetida ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Bioquímicos

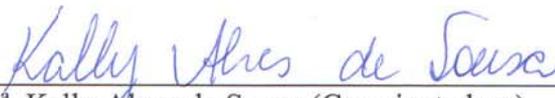
Aprovada em 13 de Abril de 2015

BANCA EXAMINADORA



---

Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto (Orientador)  
Embrapa Agroindústria Tropical - CE



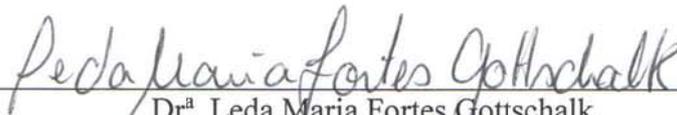
---

Dr.<sup>a</sup>. Kally Alves de Sousa (Co-orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)



---

Dr.<sup>a</sup>. Ana Paula Dionísio  
Embrapa Agroindústria Tropical - CE



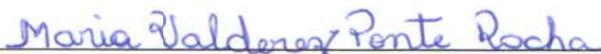
---

Dr.<sup>a</sup>. Leda Maria Fortes Gottschalk  
Embrapa Agroindústria de Alimentos - RJ



---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Diana Cristina Silva de Azevedo  
Universidade Federal do Ceará (UFC)



---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Maria Valdevez Ponte Rocha  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

*“O Senhor é minha luz e a minha salvação;  
a quem temerei? O Senhor é a força da minha vida,  
de quem me recearei?”*

*Ainda que um exército me cercasse, o meu  
coração não temeria, ainda que a guerra se levantasse  
contra mim, nele confiaria”*

*Salmo 27, v.3*

*“Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo  
e pensar uma coisa diferente”  
Roger Von Oech*

*“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado  
é alguém que acredite que ele possa ser realizado”  
Roberto Shinyashiki*

## AGRADECIMENTOS

À EMBRAPA Agroindústria Tropical por toda a infraestrutura e pessoal disponibilizado para a realização das pesquisas apresentadas neste trabalho.

Ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará por todo apoio disponibilizado durante o período do Doutorado.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP pelo apoio financeiro através da concessão da minha bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto, pela oportunidade, paciência e dedicação em fazer de sua experiência profissional e pessoal parte do meu crescimento, por sua confiança no meu trabalho ao longo de quase 9 anos de Embrapa.

À Dra. Kally Alves de Sousa, minha co-orientadora de pesquisa, que esteve comigo durante todo o doutorado, a que devo parte do conhecimento acadêmico adquirido durante toda a jornada de desenvolvimento da pesquisa e obrigada pelas orientações, sugestões para o desenvolvimento desta tese.

À Dra. Ana Paula Dionísio e a Profa. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha, por aceitarem o convite em participarem das bancas de qualificação e defesa para o enriquecimento deste trabalho.

Aos meus amigos do laboratório de Processos Agroindustriais, pelas palavras de apoio, compreensão e toda ajuda oferecida para a realização dos experimentos. Em especial, Natália Moura, que sempre esteve disposta a me ajudar na realização dos experimentos deste estudo, à Simone por sua grande amizade e pela companhia no laboratório e em todos os momentos importantes, à Tigressa pela grande amizade e pelo apoio, as minhas amigas do coração Rita, Bruna, Mirna, Eurídice, Manuella.

Aos demais amigos do Laboratório de Processos Agroindustriais Genilton, Natália Lima, Carina, Karine, Thaís, Suzane, Cívita, Nara, Cintia, Rakel pela amizade e apoio. E aos amigos que fizeram parte do Laboratório de Bioprocessos Adriana, Virna, Marisa, Ana Paula e Andréa que também contribuíram com novos conhecimentos.

Ao meu marido Carlos Gustavo pelo apoio total dentro e fora do campo de pesquisa, pela atenção, paciência, compreensão, incentivo na minha formação pessoal e profissional e por toda ajuda dada para a realização deste trabalho.

Ao meu filho Carlos Eduardo que me deu força nos momentos mais difíceis com seus beijos, abraços e palavras de carinho.

À minha mãe Maria, ao meu pai Marcone e aos meus irmãos Darley, Leila e Lilian pelo apoio moral, compreensão, atenção.

## RESUMO

O aumento da produção de biodiesel tem causado um aumento repentino na produção de glicerol residual, criando um excesso desse produto no mercado. O glicerol pode ser utilizado como fonte de carbono em processos biotecnológicos, incluindo a produção de carotenoides. Os carotenoides microbianos têm sido estudados e seu potencial reconhecido ao longo dos anos. O gênero *Rhodotorula* é conhecido por sua capacidade de biossintetizar carotenoides, tais como  $\beta$ -caroteno, toruleno e torularrodina, em diferentes proporções. Este gênero tem sido estudado devido a seu potencial para produção industrial de carotenoides, uma vez que oferecem vantagens sobre os outros gêneros em termos de taxa de crescimento elevada e uso de substratos de baixo custo. Neste contexto, o principal objetivo deste trabalho foi demonstrar a aplicabilidade do glicerol bruto como fonte de carbono na produção de pigmentos carotenoides por linhagens do gênero *Rhodotorula* através de fermentação submersa. O meio de cultura utilizado nos processos fermentativos apresentou a seguinte composição em ( $\text{g.L}^{-1}$ ): glicerol: 20,0; extrato de levedura: 1,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ : 1,0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : 5,0 e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 0,5. Para tanto foram preparados 100 mL de meio, inoculados com  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  massa seca, e incubado a  $30^\circ\text{C}$ , 150 rpm por 24 h em agitador orbital. Posteriormente o meio fermentado foi transferido para um frasco de 2L contendo 400 mL de meio e incubado por 48 horas. O meio de cultura contendo 500 mL foi utilizado para inocular o fermentador, onde o crescimento prosseguiu por 240 horas a uma taxa de aeração de  $1,0 \text{ vvm}^{-1}$ . As amostras foram retiradas em intervalos regulares de 24 horas para determinação de biomassa, glicerol, produtividade, cromaticidade  $a^*$  e carotenoides. Após os testes preliminares da investigação, selecionaram-se três linhagens do gênero *Rhodotorula* (*R. lactosa* CCT 2057, *R. glutinis* URM 5724 e *R. aurantiaca* URM 5726) capazes de produzir biomassa e sintetizar carotenoides através do glicerol P.A como fonte de carbono. Ensaios de aumento volumétrico do meio de fermentação realizados com *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 e *Rhodotorula aurantiaca* URM 5726 compararam o desempenho de glicerol bruto e P.A na produção de biomassa. Os testes em Erlenmeyers de 2 L revelaram o melhor desempenho de glicerol bruto na produção de biomassa rica em carotenoides, registrando-se  $6,2 \pm 0,1 \text{ g.L}^{-1}$  nos cultivos com *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 e produtividade em biomassa de  $0,069 \pm 0,007 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  utilizando glicerol bruto como fonte de carbono. No teste de inóculo realizado em biorreator, selecionaram-se os tempos de 48 horas de fermentação (fase exponencial) e 120 horas (fase estacionária) para as duas cepas. Nas fermentações realizadas em biorreatores de 3 L com *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 empregando o glicerol bruto como fonte carbono, observou-se que a inoculação da suspensão proveniente de um cultivo de 48 h de propagação influenciou maiores valores de produção de biomassa ( $6,35 \pm 0,3 \text{ g.L}^{-1}$ ) e produtividade ( $0,080 \pm 0,004 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ). Os testes em biorreatores também revelaram que a temperatura de incubação de  $30^\circ\text{C}$  e controle do pH em 6 foram as melhores condições para a síntese de biomassa e carotenoides. Os cultivos mantidos a  $30^\circ\text{C}$  registraram  $6,5 \pm 0,3 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa e  $0,546 \pm 0,02 \text{ mg.g}^{-1}$  de carotenoides. As fermentações mantidas em pH 6 apresentaram os maiores valores de produção de carotenoides ( $0,576 \pm 0,02 \text{ mg.g}^{-1}$ ). O aumento da concentração do inóculo e as estratégias de alimentação do biorreator, nas condições avaliadas, não impactaram consideravelmente no aumento da produção de biomassa e carotenoides por *R. mucilaginosa* CMIAT 164.

Palavras-Chave: *Rhodotorula*, fermentação, biomassa, carotenoides.

## ABSTRACT

The increased production of biodiesel has caused a sudden increase in the production of glycerol, creating an excess of this product on the market. Glycerol can be used as biotechnological processes carbon source, including the carotenoids production. The microbial carotenoids have been studied and its potential recognised over the years. The genus *Rhodotorula* is renowned for its ability to biosintetizar carotenoids, such as  $\beta$ -carotene, toruleno and torularhodin, in different proportions. This genus has been studied due to their potential for industrial production of carotenoids, once that offer advantages over other genres in terms of high growth rate and use of low cost substrates. In this context, the main objective of this work was to demonstrate the applicability of crude glycerol as a carbon source on production of carotenoids pigments for the genus *Rhodotorula* by submerged fermentation. The culture medium used in fermentation processes performed as follows in (g. L<sup>-1</sup>): glycerol: 20.0; yeast extract: 1.0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:1.0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:5.0 and 4.7 MgSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O: 0.5. For both were prepared 100 mL of medium, inoculated with 0.1 g L<sup>-1</sup> dry mass, and incubated at 30° C, 150 rpm for 24 hours in orbital shaker. Subsequently the fermented medium was transferred to a 2 L bottle containing 400 mL and incubated for 48 hours. The culture medium containing 500 mL was used to inoculate the fermentor, where growth continued for 240 hours under aeration rate of 1.0 vvm<sup>-1</sup>. The samples were taken at regular intervals of 24 hours for determination of biomass, glycerol, productivity, the chromaticity a\* and carotenoids. After the preliminary tests of research, selected three strains of *Rhodotorula* genus (*R. lactosa* CCT 2057, *R. glutinis* URM 5724 e *R. aurantiaca* URM 5726) capable of producing biomass and synthesize carotenoids via glycerol. Testing of volumetric expansion of the fermentation medium with *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 and *Rhodotorula aurantiaca* 5726 URM compared the performance of raw glycerol and biomass production. In tests of 2 L Erlenmeyer flasks revealed the best performance of crude glycerol in the production of biomass rich in carotenoids, registering  $6.2 \pm 0.19$  g.L<sup>-1</sup> in *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 crops and biomass productivity of  $0.069 \pm 0.007$  g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> using crude glycerol as a carbon source. Inoculum test held in bioreactor, selected the times of 48 hours of fermentation (exponential phase) and 120 hours (stationary phase) for the two strains. In the fermentations conducted in 3 L bioreactors with *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 employing crude glycerol as carbon source, it was observed that the inoculation of the suspension from a 48 h culture propagation influenced higher biomass production values ( $6.35 \pm 0.3$  g L<sup>-1</sup>) and productivity ( $0.080 \pm 0.004$  g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>). The tests also revealed that the bioreactors in incubation temperature of 30 °C and pH control in 6 were the best conditions for the synthesis of biomass and carotenoids. The cultures kept at 30 °C registered biomass  $6.5 \pm 0.3$  g.L<sup>-1</sup> and  $0.546 \pm 0.02$  mg.g<sup>-1</sup> of carotenoids. Fermentations kept at pH 6 showed higher carotenoids production values ( $0.576 \pm 0.02$  mg.g<sup>-1</sup>). Increase in the concentration of the inoculum and the feeding strategies of bioreactor, under the conditions evaluated no impact considerably on increasing the production of biomass and carotenoid by *R. mucilaginosa* CMIAT 164.

Keywords: *Rhodotorula*, fermentation, biomass, carotenoids.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	4
2.1	Produção de biodiesel e a geração do glicerol	4
2.2	Definição e características do glicerol	7
2.3	Uso do glicerol em processos Biotecnológicos	9
2.4	Bioconversão do Glicerol	12
2.5	Carotenoides	14
2.6	Micro-organismos Produtores de Carotenoides através de Processos Biotecnológicos	17
2.7	Leveduras do gênero Rhodotorula	24
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	28
3.1	Micro-organismos e Técnicas de Manutenção	28
3.2	Características do glicerol P.A e glicerol bruto	31
3.3	Meios de Cultivo	31
3.4	Ativação e Preparo do Inóculo para os Experimentos	33
3.5	Etapas Experimentais	34
3.6	Métodos Analíticos	40
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	44
4.1	Teste de Seleção dos Micro-organismos em Meio EM Contendo Glicerol P.A	44
4.2	Teste de Seleção em Meio Contendo Glicerol P.A.	45
4.3	Testes em Erlenmeyers de 2 L: comparação entre o desempenho do glicerol P.A e glicerol bruto	48
4.4	Fermentação em Biorreator de Bancada: Influência do tempo de propagação do inóculo	53
4.5	Influência da temperatura na produção de levedura carotenogênica	58
4.6	Influência do pH na produção da levedura carotenogênica	67
4.7	Influência do aumento do volume de inóculo no processo fermentativo	70
4.8	Testes preliminares da alimentação do biorreator	73
	<b>CONCLUSÕES</b>	77
	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b>	78
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	79
	<b>ANEXO A</b>	90
	<b>ANEXO B</b>	91

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Produção de Biodiesel Acumulada .....	5
<b>Figura 2</b> – Consumo de Biodiesel .....	6
<b>Figura 3</b> – Rota metabólica do glicerol via DHA (Dihidroxiacetona) por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> e outras leveduras utilizando glicerol como fonte de carbono segundo Wang et al., 2001; Silva; Mack; Contiero, 2009; Amaral et al., 2009; Nicol; Marchand; Lubitz, 2012 (adaptado a partir de Silva, et al., 2009; Bories et al., 1991).....	13
<b>Figura 4</b> –Fórmula estrutural dos principais pigmentos formados pela levedura do gênero <i>Rhodotorula</i> .....	14
<b>Figura 5</b> – Via biossintética a partir de acetil-CoA para $\beta$ -caroteno, toruleno e torularrodina em espécies de <i>Rhodotorula</i> .....	19
<b>Figura 6</b> – Principais etapas experimentais executadas.....	28
<b>Figura 7</b> – Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre a sequência parcial do gene RNA ribossomal 26S da amostra CPQBA899/14DRM-01 e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados GenBank. ....	30
<b>Figura 8</b> – Processo de ampliação volumétrica até biorreator de bancada utilizando glicerol como fonte de carbono. ....	39
<b>Figura 9</b> – Desenho esquemático do método de extração de carotenoides .....	43
<b>Figura 10</b> – Perfil de cromaticidade $a^*$ (+ $a^*$ em direção do vermelho e - $a^*$ em direção do verde) <i>R. lactosa</i> CCT 2057(■), <i>R. rubra</i> CCT 5470 (■), <i>R. glutinis</i> URM 3961 (■), <i>R. glutinis</i> URM 5724 (■), <i>R. glutinis</i> URM 1348 (■), <i>R. rubra</i> URM 5183 (■), <i>R. aurantiaca</i> URM 5726 (■), <i>R. minuta</i> URM 5185 (■) durante os testes de seleção conduzidos a 30 °C e 150 rpm durante 120 h.....	44
<b>Figura 11</b> – Produção de biomassa (A) e consumo de glicerol (B) por <i>R. lactosa</i> CCT 2057(▲), <i>R. glutinis</i> URM 5724 (●) e <i>R. aurantiaca</i> URM 5726 (■) a 30 °C e 150 rpm em meio contendo glicerol .....	45
<b>Figura 12</b> – Perfil da cromaticidade $a^*$ por <i>R. lactosa</i> CCT 2057 (▲), <i>R. glutinis</i> URM 5724 (●), <i>R. aurantiaca</i> URM 5726 (■) a 30 °C e 150 rpm em meio contendo glicerol.....	46
<b>Figura 13</b> – Comportamento do pH das leveduras de <i>R. lactosa</i> CCT 2057 (▲), <i>R. glutinis</i> URM 5724 (●), <i>R. aurantiaca</i> URM 5726 (■) a 30 °C e 150 rpm em meio contendo glicerol .....	47
<b>Figura 14</b> – Produção de biomassa em glicerol P.A (■) e glicerol bruto (▲) por <i>R. aurantiaca</i> UMR 5726 (A) e <i>R. mucilaginosa</i> CMIAT 164 (C) e Consumo de glicerol P.A (■) e glicerol bruto (▲) por <i>R. aurantiaca</i> UMR 5726 (B) e <i>R. mucilaginosa</i> CMIAT 164 (D) na ampliação volumétrica de 500 mL a 30 °C e 150 rpm .....	49
<b>Figura 15</b> – Cromaticidade $a^*$ em glicerol P.A (■) e glicerol bruto (▲) por <i>R. aurantiaca</i> UMR 5726 (A) e <i>R. mucilaginosa</i> CMIAT 164 (C) e Produtividade em biomassa em glicerol P.A (■) e glicerol bruto (▲) por <i>R. aurantiaca</i> UMR 5726 (B) e <i>R. mucilaginosa</i> CMIAT 164 (D) na ampliação volumétrica de 500 mL a 30 °C e 150 rpm.....	52
<b>Figura 16</b> – Produção de biomassa (A) e Consumo de glicerol bruto (B) por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CMIAT164 Inóculo de 48h (▲) e Inóculo de 120h (■) e <i>R. aurantiaca</i> URM 5726 Inóculo de 48h (●) e Inóculo de 120h (▼) em biorreator de bancada de 3 L a 30 °C e 150 rpm .....	55
<b>Figura 17</b> – Cromaticidade $a^*$ (A) e Produtividade em biomassa (B) por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CMIAT 164 Inóculo de 48h (▲) e Inóculo de 120h (■) e <i>R.</i>	

	<i>aurantiaca</i> URM 5726 Inóculo de 48h (●) e Inóculo de 120h (▼) em biorreator de bancada de 3 L a 30 °C e 150 rpm .....	56
<b>Figura 18</b>	– Perfil de pH por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CMIAT 164: Inóculo de 48h (▲) e Inóculo de 120h (■), e <i>R. aurantiaca</i> URM 5726: Inóculo de 48h (●) e Inóculo de 120h (▼) em biorreator de bancada de 3 L a 30 °C e 150 rpm.....	57
<b>Figura 19</b>	– Produção de biomassa (A) e Consumo de glicerol (B) por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CMIAT 164 sob diferentes temperaturas de incubação 10 °C (▲), 15 °C (●), 20 °C (◆), 25 °C (■) e 30 °C (▼) em biorreator de bancada de 3 L a 150 rpm.....	59
<b>Figura 20</b>	– Produtividade em biomassa por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CMIAT 164 sob diferentes temperaturas de incubação 10 °C (▲), 15 °C (●), 20 °C (◆), 25 °C (■) e 30 °C (▼) em biorreator de bancada de 3 L a 150 rpm.....	60
<b>Figura 21</b>	– Produção de biomassa em 144 horas de fermentação por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CMIAT 164 sob diferentes temperaturas de incubação (10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C e 30 °C) em biorreator de bancada de 3 L a 150 rpm.....	61
<b>Figura 22</b>	– Produtividade em carotenoides por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CMIAT 164 sob diferentes temperaturas de incubação 15 °C (●), 20 °C (◆), 25 °C (■) e 30 °C (▼) em biorreator de bancada de 3 L a 150 rpm .....	63
<b>Figura 23</b>	– Velocidades específicas para a produção de biomassa (A), consumo de glicerol (B) e produção de carotenoides (C) por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CMIAT 164 sob diferentes temperaturas de incubação 10 °C (▲), 15 °C (●), 20 °C (◆), 25 °C (■) e 30 °C (▼) em biorreator de bancada de 3 L a 150 rpm.....	64
<b>Figura 24</b>	– Perfil de pH por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CMIAT 164 sob diferentes temperaturas de incubação 10 °C (▲), 15 °C (●), 20 °C (◆), 25 °C (■) e 30 °C (▼) em biorreator de bancada de 3 L a 150 rpm .....	66
<b>Figura 25</b>	– Produção de biomassa (A) e Consumo de glicerol (B) por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CMIAT 164 sob diferentes controles de pH 3,0 (▲), 4,0 (●), 5,0(◆), 6,0 (▼), 7,0 (○) e sem ajuste de pH - controle (■) em biorreator de bancada de 3 L a 30 °C e 150 rpm .....	68
<b>Figura 26</b>	– Produtividade em biomassa por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CMIAT 164 sob diferentes controles de pH 3,0 (▲), 4,0 (●), 5,0(◆), 6,0 (▼), 7,0 (○) e sem ajuste de pH - controle (■) em biorreator de bancada de 3 L a 30 °C e 150 rpm .....	69
<b>Figura 27</b>	– Produtividade em carotenoides por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CMIAT 164 sob diferentes controles de pH 3,0 (▲), 4,0 (●), 5,0(◆), 6,0 (▼), 7,0 (○) e sem ajuste de pH - controle (■) em biorreator de bancada de 3 L a 30 °C e 150 rpm .....	70
<b>Figura 28</b>	– Produção de biomassa (A) e Consumo de glicerol (B) por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CMIAT 164 em volume de inóculo 2,0 g.L <sup>-1</sup> (▲) e inóculo de 0,1 g.L <sup>-1</sup> - controle (▼) em biorreator de bancada de 3 L a 30 °C e 150 rpm.....	71
<b>Figura 29</b>	– Produção de biomassa (A) e Consumo de glicerol (B) por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CMIAT 164 sob diferentes meios de alimentação: FCC (▲) e MCC (■) – a partir de 96 h e término em 192 h de fermentação e condição CONTROLE (●) em biorreator de bancada de 3 L a 30 °C e 150 rpm.....	74
<b>Figura 30</b>	– Produção de biomassa (A) e Cromaticidade <i>a</i> * (B) por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CMIAT 164 em meio contendo Sabouraud original (▲) e Sabouraud modificado (▼) conduzido em Erlenmeyer de 2 L por 240 h, 30° C e 150 rpm.....	91
<b>Figura 31</b>	– Consumo de glicerol por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CMIAT 164 em meio contendo Sabouraud original (▲) e Sabouraud modificado (▼) conduzido em Erlenmeyer de 2 L por 240 h, 30° C e 150 rpm.....	91

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Parâmetros de qualidade de diferentes categorias de glicerol .....	8
<b>Tabela 2</b> – Micro-organismos empregados nos ensaios de seleção para avaliar a produção de carotenoides .....	29
<b>Tabela 3</b> – Composição dos principais meios utilizados nos experimentos.....	31
<b>Tabela 4</b> – Produção de carotenoides em ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CMIAT 164 a partir de 120 horas de fermentação sob diferentes temperaturas de incubação (15 °C, 20 °C, 25 °C e 30 °C) em biorreator de bancada de 3 L a 150 rpm.....	62
<b>Tabela 5</b> – Produção de carotenoides em ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CMIAT 164 a partir de 120 horas de fermentação sob diferentes controles de pH (3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e sem ajuste de pH – controle) em biorreator de bancada de 3 L a 30 °C e 150 rpm.....	70
<b>Tabela 6</b> – Produção de carotenoides por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CMIAT 164 em fermentação com inóculo de $2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (▲) e controle (▼) em biorreator de bancada de 3 L a 30 °C e 150 rpm.....	72
<b>Tabela 7</b> – Produção de carotenoides em ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CMIAT164 sob diferentes meios de alimentação: FCC, MCC e condição CONTROLE em biorreator de bancada de 3 L a 30 °C e 150 rpm .....	75

**SIMBOLOGIA**

- $L^*$  - Variação de luminosidade do preto ao branco
- $a^*$  - Variação de luminosidade do verde ao vermelho
- $b^*$  - Variação de luminosidade do azul ao amarelo
- $X_0$  - Concentração inicial de células em g.L<sup>-1</sup>
- $X_f$  - Concentração final de células em g.L<sup>-1</sup>
- $\Delta X$  - =  $X_f - X_0$
- $\Delta S$  - =  $S_f - S_0$
- $P_x$  - Produtividade em biomassa
- $P_P$  - Produtividade do produto
- $\mu_x$  - Velocidade específica de crescimento da levedura
- $\mu_S$  - Velocidade específica de consumo de substrato
- $\mu_P$  - Velocidade específica de formação do produto
- $A/Abs$  - Absorbância
- $A_{cm}^{1\%}$  - Coeficiente de absorção do carotenoide

**ACRÔNIMOS E ABREVIATURAS**

<b>Símbolo</b>	<b>Significado</b>
CMIAT	Coleção de Micro-organismos de Interesse para Agroindústria Tropical
URM	Micoteca URM - UFPE
EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
RFS	Renewable Fuel Standard - Padrão de Combustível Renovável
NBB	National Biodiesel Board
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
MME	Ministério de Minas e Energia
APROBIO	Associação dos Produtores de Biodiesel do Brasil
TAG	Triacilglicerol
ASTM	American Society Of Testing And Materials

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da produção de biodiesel tem causado um aumento na produção de glicerol residual, criando um excesso desse produto no mercado (SAENGE et al., 2011). Até poucos anos atrás, o glicerol não estava disponível a baixo custo para prever sua utilização em larga escala. No entanto, com o desenvolvimento recente e contínuo da produção de biodiesel, agora é concebível imaginar um mercado de glicerol como matéria prima para diferentes bioprocessos (OCHOA-ESTOPIER et al., 2010).

Em vários países europeus, o glicerol bruto é simplesmente tratado como um novo tipo de efluente industrial e, sua eliminação poderá causar sérios problemas ambientais em um futuro próximo (LIANG et al., 2010; ANDRE et al., 2010; MU; XIU; ZHANG, 2008). Portanto, fazem-se necessárias pesquisas atuais para descobrir novos usos do glicerol bruto, fazendo com que a produção do biodiesel seja mais rentável e sustentável (SAENGE et al., 2011; SILVA et al., 2009). No entanto, mesmo considerando-se as inúmeras possibilidades do uso do glicerol bruto em bioprocessos, devem-se estabelecer investigações mais robustas sobre o tema, uma vez que esse substrato tem uma composição bastante complexa. Além de impurezas, o glicerol bruto contém sais de potássio, sódio e metanol que podem comprometer o desenvolvimento microbiano (RWYINSKA et al., 2013).

Relevantes pesquisas tem sido realizadas com o intuito de sintetizar produtos de alto valor agregado, a partir da bioconversão do glicerol bruto derivado do biodiesel. Neste contexto, é pertinente apresentar a possibilidade de uso do glicerol como fonte de carbono para bactérias e leveduras sob condições aeróbicas e anaeróbicas para a obtenção de energia metabólica (SAENGE et al., 2011; ZHU; ZONG; WU, 2008; RIVALDI et al., 2008) e sua transformação via microbiológica em metabólitos de interesse industrial (MEINICKE, 2008). O glicerol bruto pode ser utilizado por micro-organismos como substrato para obtenção de diferentes bioprodutos: 1,3-propanodiol, biobutanol, ácidos orgânicos, lipídios, enzimas e biomassa microbiana, dentre outros, em fermentações realizadas por leveduras, fungos ou algas, através de operações de batelada, batelada alimentada ou contínuas (CHATZIFRAGKOU et al., 2011; CHEIRSILP; KITCHA; TORPEE, et al., 2012; TACCARI, et al., 2012). Além disso, estudos recentes tem demonstrado o uso do glicerol bruto para a produção de carotenoides (CUTZU et al., 2013; LIU et al., 2012; SAENGE et al., 2011).

Os carotenoides são pigmentos naturais, amplamente distribuídos na natureza, com vasta diversidade de estruturas e funções que vão desde o seu papel original evolutivo na fotossíntese, como pigmentos antioxidantes, até como precursores da vitamina A (FRENGOVA; BESHKOVA, 2009; SQUINA; MERCADANTE, 2003). Existe um interesse crescente no uso de carotenoides, devido as suas habilidades como antioxidantes naturais e sequestrantes de radicais livres, auxiliando na prevenção de doenças degenerativas como o câncer, doenças cardiovasculares, estágios patológicos e envelhecimento (MAROVA et al., 2012; MALDONADE; RODRIGUEZ-AMAYA; SCAMPARINI, 2008).

Os carotenoides sintetizados por micro-organismos têm sido continuamente estudados e seu potencial reconhecido. A principal razão pelo interesse de utilizar micro-organismos para produzir carotenoides, relaciona-se à facilidade de aumentar a síntese desse composto pela manipulação ambiental e genética. Os custos de carotenoides produzidos por fermentação também podem ser minimizados pelo uso de subprodutos industriais de baixo custo como fonte de nutrientes (AKSU; EREN, 2005; NELIS; LEENHEER, 1991; MALDONADE; RODRIGUEZ-AMAYA; SCAMPARINI, 2008).

Dentre os micro-organismos produtores de carotenoides tais como: *Streptomyces chrestomyceticus*, *Blakeslea trispora*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Flavobacterium* sp. e *Phaffia*, destaca-se o gênero *Rhodotorula*. É um gênero amplamente distribuído na natureza e com capacidade de biossintetizar carotenoides como  $\beta$ -caroteno, toruleno e torularrodina, em diferentes proporções. Este gênero tem sido estudado devido a seu potencial para produção industrial de carotenoides, uma vez que oferece vantagens significativas sobre os outros gêneros: elevada taxa de crescimento e capacidade de utilizar substratos de baixo custo, como aveia, trigo, cevada, milho, caldo ou melaço de cana-de-açúcar, soro do leite, soro de queijo, farinha de feijão hidrolisada, extratos de soja e farinha de milho (ALMANZA et al., 2014; MALISORN; SUNTORNSUK, 2008, 2009; AKSU; EREN, 2005, 2007; PARK et al., 2005).

Diante deste contexto apresentado, o principal objetivo desse trabalho foi avaliar a aplicabilidade do glicerol, como fonte de carbono de baixo custo na produção de pigmentos carotenoides, por linhagens do gênero *Rhodotorula* através de fermentação submersa. Para tal, foram delimitados os seguintes objetivos específicos:

- Selecionar linhagens do gênero *Rhodotorula* capazes de sintetizar carotenoides utilizando glicerol P.A como fonte de carbono;
- Comparar o emprego do glicerol bruto procedente da cadeia produtiva do biodiesel de soja com o glicerol P.A, utilizando as espécies *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT

164 e *Rhodotorula aurantiaca* URM 5726;

- Ampliar a escala do processo fermentativo empregando as leveduras *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 e *Rhodotorula aurantiaca* URM 5726, utilizando glicerol bruto como fonte de carbono;
- Avaliar parâmetros operacionais (temperatura e pH) do processo fermentativo da produção de carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 em biorreator de bancada;
- Comparar os regimes de condução (batelada simples e alimentada) do processo fermentativo na produção de carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 em biorreator de bancada;
- Extrair e quantificar os carotenoides intracelulares produzidos por *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 nos ensaios de controle de temperatura e pH, batelada alimentada e aumento do volume de inóculo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Produção de biodiesel e a geração do glicerol*

A *National Biodiesel Board* dos Estados Unidos, convencionalmente, define o biodiesel como derivado monoalquil-éster de ácidos graxos de cadeia longa, proveniente de fontes renováveis, como óleos vegetais e/ou gordura animal, cuja utilização está associada à substituição de combustíveis fósseis sem alterações nos motores de ignição por compressão (NATIONAL BIODIESEL BOARD, 1996). As especificações do biodiesel são estabelecidas pela *American Society of Testing and Materials* (ASTM), através da ASTM D6751/2002.

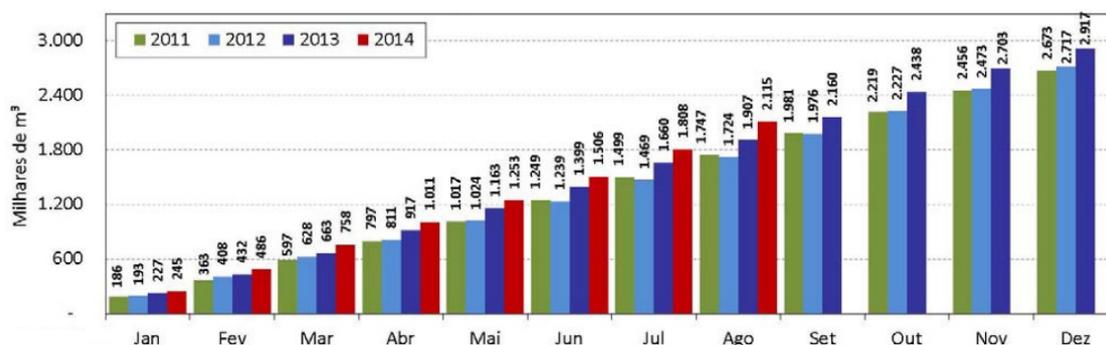
O biodiesel é um combustível alternativo atualmente produzido em várias partes do mundo. Nos últimos anos, um crescimento exponencial da produção de biodiesel tem sido observado na União Europeia e nos Estados Unidos (RWYINSKA et al., 2013). A indústria do biodiesel tornou-se importante devido à escassez de combustíveis de origem fóssil e também ao aumento da consciência sobre a questão ambiental.

O Brasil foi pioneiro no uso de energia limpa (em relação ao balanço de CO<sub>2</sub>) e fontes de energia (biocombustíveis), quando o governo decidiu substituir gasolina por álcool em 1973. Em meados de 1980, cerca de 95% dos automóveis produzidos no Brasil, foram alterados para a combustão do etanol. Veículos *flex* de combustível, que foram projetados em 2003, representam hoje mais de 80% dos automóveis vendidos no Brasil. O uso de biocombustíveis certamente continuará crescendo, assim como a disponibilidade de petróleo será claramente limitada. Estimativas mostraram um declínio gradativo na produção de petróleo e de acordo com algumas projeções é possível que as reservas de petróleo sejam completamente esgotadas em 2050 (SILVA; MACK; CONTIERO, 2009).

Atualmente existem, no Brasil, 58 plantas produtoras de biodiesel autorizadas pela ANP (Agência Nacional do Petróleo) para operação, correspondendo a uma capacidade total autorizada de 21.046,79 m<sup>3</sup>/dia. A capacidade de produção do biodiesel no Nordeste brasileiro, em usinas autorizadas para realizar a operação, é de 1265,13 m<sup>3</sup>/dia. No Ceará, a produção do biodiesel é de 301,71 m<sup>3</sup>/dia. A Medida Provisória nº 647, de 28 de maio de 2014, convertida na Lei nº 13.033, de 24 setembro de 2014, dispõe sobre a adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel comercializado com o consumidor final. Por meio do referido dispositivo legal, o percentual obrigatório do biodiesel misturado ao óleo diesel passou de 5%

para 6% a partir do dia 1º de julho de 2014, chegando a 7% em 1º de novembro de 2014 (APROBIO-ANP 2014).

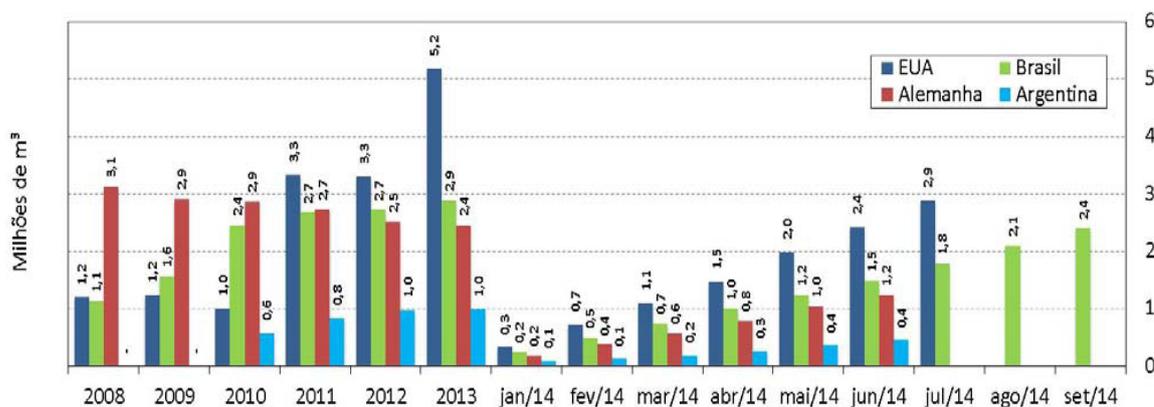
Desde a sua implementação, em julho, já se verifica forte crescimento da produção de biodiesel no País: no primeiro mês da entrada em vigor da elevação para 6% do teor deste biocombustível, a produção cresceu 26%, atingindo o recorde mensal 302 mil m<sup>3</sup>. Dados preliminares, com base nas entregas dos leilões promovidos pela ANP, mostram que a produção em setembro de 2014 foi de 303 mil m<sup>3</sup>. No acumulado do ano, a produção atingiu 2.434 mil m<sup>3</sup>, um acréscimo de 12,7% em relação ao mesmo período de 2013 (2.160 mil m<sup>3</sup>) (Figura 1). Essa elevação na mistura de biodiesel ao diesel consolida o Brasil entre os dois maiores produtores de biodiesel no mundo, junto com os Estados Unidos, ultrapassando definitivamente os tradicionais produtores europeus (os primeiros a utilizarem este biocombustível em larga escala). O aumento da mistura permitirá ainda o melhor aproveitamento da capacidade de produção de biodiesel no país e beneficiará agricultores familiares, com geração de renda. A lei determina que o biodiesel, necessário à adição obrigatória ao óleo diesel, deverá ser fabricado preferencialmente a partir de matérias primas produzidas pela agricultura familiar (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2014).



**Figura 1** – Produção de Biodiesel Acumulada

**Fonte:** Ministério de Minas e Energia - Boletim Mensal dos Combustíveis Renováveis do Ministério de Minas e Energia (nº 80, setembro de 2014, p. 5)

Cerca de 73% das matérias-primas utilizadas na fabricação do biodiesel são soja, cultivada por pequenos, médios e grandes agricultores. Em segundo lugar está o sebo bovino (22%) e em seguida as demais matérias-primas que correspondem a 5% da produção do biodiesel: óleos de algodão, fritura, girassol e outros. Em 2013, o Brasil foi o segundo maior consumidor de biodiesel, atrás somente dos Estados Unidos da América. A Figura 2 mostra o consumo anual de biodiesel dos EUA, Alemanha, Argentina e Brasil. No Brasil o consumo brasileiro foi de aproximadamente 2,4 milhões de metros cúbicos até setembro de 2014 (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2014).



**Figura 2** – Consumo de Biodiesel

**Fonte:** Ministério de Minas e Energia - Boletim Mensal dos Combustíveis Renováveis do Ministério de Minas e Energia (nº 80, setembro de 2014, p. 14)

Todavia, o crescente aumento da produção mundial de biodiesel gera, concomitantemente, um aumento considerável na disponibilidade do glicerol, criando um excesso de oferta no mercado do processo de fabricação do biodiesel (OH et al., 2011). Geralmente, cerca de 4,53 kg de glicerol bruto é gerado para cada 45,3 kg de biodiesel produzido. O glicerol é um material de utilidade notável, com aplicação nas mais diversificadas áreas. Uma combinação única de propriedades físicas e químicas, o torna um produto tecnicamente versátil e de fácil manuseio, relativamente compatível com muitas outras substâncias. Fisicamente, o glicerol é um líquido viscoso solúvel em água, incolor, quase inodoro, higroscópico, com um elevado ponto de ebulição. Quimicamente, o glicerol é um álcool tri-hídrico, capaz de reagir como um álcool, estável sob a maioria das condições (AYOUB; ABDULLAH, 2012).

Entretanto, o excesso de produção do glicerol e sua eliminação indiscriminada podem causar sérios problemas ambientais. Acredita-se que o refinamento do glicerol bruto à altos graus de pureza consoma muita energia, desencadeando elevação nos custos da produção. Assim, uma das muitas aplicações promissoras para o uso de glicerol é a sua bioconversão em compostos de alto valor agregado através de fermentações microbianas. O glicerol não é somente barato e abundante, mas possui maior grau de redução que os açúcares, oferecendo oportunidade de obter produtos químicos reduzidos, como o succinato, etanol, xilitol, propionato, hidrogênio, etc., a rendimentos mais elevados do que aqueles obtidos utilizando açúcares (LIU; MEI; KOH, 2011; MANTZOURIDOU; NAZIRINI; TSIMIDOU, 2008).

Para o seu desenvolvimento seja sustentável, é sobretudo necessário garantir que o glicerol possa ser produzido continuamente sem competir com a indústria de alimentos (XU et

al., 2012). Uma das principais preocupações dos produtores de glicerol é a redução significativa do preço resultante do crescimento rápido da produção de biodiesel (GONÇALVES et al, 2014; EASTERLING et al., 2009; TACCARI et al., 2012).

## **2.2 Definição e características do glicerol**

O glicerol (1,2,3 propanotriol ou glicerina) foi descoberto por Scheele em 1779 durante o processo de saponificação de azeite de oliva. Pasteur (1858) também observou sua formação como um subproduto da fermentação alcoólica, em concentrações de 2,5 a 3,6% do conteúdo de etanol, podendo ser o glicerol o segundo maior produto formado durante a fermentação alcoólica (REHM, 1988). Segundo Ayoub e Abdullah (2012), o glicerol possui um alto teor de carbono (52,8%) e conteúdo de oxigênio (36,2%). Devido a estas características o glicerol tem sido considerado um composto valioso, tornando-se uma fonte de energia renovável para várias aplicações, tais como, medicamentos, produtos alimentícios e cosméticos.

O termo glicerol aplica-se somente ao componente químico puro 1,2,3-propanotriol enquanto o termo glicerina aplica-se aos produtos comerciais purificados. (AYOUB; ABDULLAH, 2012; MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009). Vários níveis e designações de glicerina estão disponíveis comercialmente. Eles diferem um pouco em seu conteúdo de glicerol e em outras características, tais como cor, odor e impurezas. A chamada glicerina loira é normalmente utilizada para designar a glicerina oriunda dos processos de produção do biodiesel, onde a fase glicerínica sofreu um tratamento ácido para neutralização do catalisador e remoção de ácidos graxos eventualmente formados no processo. Em geral, esta glicerina contém cerca de 80% de glicerol, além de água, metanol e sais dissolvidos (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009).

A Tabela 1 apresenta as características do glicerol. O glicerol pode ser classificado em três categorias principais: glicerol bruto, glicerol purificado e glicerol sintetizado comercialmente. As diferenças entre o glicerol purificado e comercial são mínimas, enquanto entre o glicerol bruto e purificado as diferenças são notadamente maiores. Como também destacado na Tabela 1, o glicerol bruto pode apresentar entre 60-80% de pureza. Da mesma forma, o teor de umidade, cinzas e sabão estão presentes em maior quantidade no glicerol bruto. O glicerol bruto é ligeiramente mais ácido que demais tipos de glicerol, bem como, possui cor escura característica devido à presença de impurezas (AYOUB; ABDULLAH, 2012).

**Tabela 1** – Parâmetros de qualidade de diferentes categorias de glicerol

Parâmetros	Glicerol bruto	Glicerol purificado	Glicerol comercial
Conteúdo de glicerol (%)	60 - 80	99,1 - 99,8	99,2 - 99,8
Umidade (%)	1,5 - 6,5	0,11- 0,8	0,14 - 0,29
Cinzas (%)	1,5 - 2,5	0,054	<0,002
Sabão (%)	3,0 - 5,0	0,56	N/A
Acidez (pH)	0,7 - 1,3	0,10 - 0,16	0,04 - 0,07
Cloreto (ppm)	ND	1,0	0,6 - 9,5
Cor (APHA)	Escuro	34 - 45	1,8 - 10,3

**Fonte:** Ayoub e Abdullah (2012)

O glicerol é um poliálcool que está presente em diferentes espécies, incluindo protistas unicelulares e mamíferos. No entanto, é difícil encontrarmos o glicerol na sua forma “livre” nesses organismos, pois geralmente se encontra como um triglicerídeo combinado como, por exemplo, a ácidos graxos (MORRISON, 1994). A molécula de glicerol contém três grupos hidroxila (-OH) que são hidrofílicas responsáveis por sua solubilidade em água e a sua natureza higroscópica. Por conseguinte, o glicerol é uma substância “multiuso” com muitas aplicações tais como: uma fonte renovável de produtos biodegradáveis, aplicações no processo de refinaria verde e pode ter um grande valor ambiental exigido pela sociedade moderna que favorece a não-dependência de esgotar as fontes de petróleo (AYOUB; ABDULLAH, 2012). O glicerol, desde 1959, é reconhecido como substância atóxica, permitido como aditivo em alimentos, e também considerado como substância “GRAS” (*Generally Regraded as Safe*) pela FDA, órgão regulador de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos. No Brasil, seu uso em produtos alimentícios é assegurado pela Resolução de nº 386, de 5 de Agosto de 1999 (ARRUDA; RODRIGUES; FELIPE, 2007).

O glicerol bruto é o principal subproduto da produção do biodiesel e por não haver legislação para a regulamentação do descarte de glicerina, a produção do biodiesel pode causar graves problemas ambientais, caso a glicerina não seja devidamente aproveitada. Com a produção crescente de biodiesel são geradas quantidades consideráveis desse resíduo. Dependendo da matéria-prima utilizada para produzir o biodiesel, o glicerol residual obtido pode conter várias espécies químicas comuns como o metanol, sabão, bem como fósforo, potássio, cálcio, silício, sódio e compostos de zinco, em diversas quantidades. Observa-se assim a necessidade do incentivo ao desenvolvimento de novas tecnologias que utilizem este co-produto evitando seu descarte no ambiente (BERNARDINO et al., 2013; PETRIK et al., 2013; ABAD; TURON, 2012; XU et al., 2012).

### **2.3 *Uso do glicerol em processos Biotecnológicos***

Na indústria de alimentos o glicerol é utilizado como aditivo alimentar em função de suas propriedades estabilizantes, antioxidantes, seqüestrantes, emulsificantes e umectantes. Como produto farmacêutico sua aplicação se deve à sua alta viscosidade, o que permite sua utilização em xaropes. Também é considerado como um agente crioprotetor em micro-organismos, pois não permite a formação de cristais de gelo na célula, mantendo a estabilidade da parede celular e vitalidade da mesma durante o processo de congelamento para sua conservação. Além das aplicações na indústria de alimentos, terapêuticas e em diagnósticos, o glicerol é ainda empregado para produção de resinas e poliésteres devido à sua reatividade polifuncional e também como lubrificante na indústria têxtil além de poder ser utilizado como solvente de muitos compostos (ZHOU et al., 2014; SILVA; MACK; CONTIERO, 2009; ARRUDA; RODRIGUES; FELIPE, 2007; WANG et al., 2001). Muitas espécies de animais como vacas, porcos, galinhas e frangos são alimentadas com suplementos à base de glicerol residual (PETRIK et al., 2013; ABAD; TURON, 2012).

A valorização biotecnológica mais comum de glicerol refere-se a sua conversão em 1,3-propanodiol. Além disso, o glicerol bruto vem sendo utilizado como substrato para a produção de outros metabólitos microbianos, tais como ácidos orgânicos, polióis, lipídeos microbianos e biomassa em fermentações por espécies de leveduras, fungos ou algas em batelada descontínua alimentada ou operações contínuas (CHATZIFRAGKOU et al., 2011; ANDRÉ et al., 2010). Carotenoides, ácido cítrico, ácido succínico, polihidroxialcanoatos, ácidos graxos poliinsaturados e ramnolipídeos são também produtos de valor agregado obtidos por fermentação à base de glicerol (PETRIK et al., 2013; ABAD; TURON, 2012; TACCARI et al., 2012; RYWINSKA et al., 2010; PAPANIKOLAOU et al., 2002).

O glicerol é abundante na natureza, uma vez que é o componente estrutural de diversos lipídeos, podendo ser produzido por fermentação microbiana ou síntese química a partir de matéria-prima petroquímica. Devido à sua ampla ocorrência na natureza, muitos micro-organismos conhecidos podem utilizar naturalmente o glicerol como única fonte de carbono e energia. A substituição de fontes de carbono tradicionais, como a glicose, por fontes menos onerosas tem um impacto positivo sobre a economia do bioprocessos. A redução de custos em meios de crescimento, com o mínimo de efeitos indesejados, é fundamental para uma potencial aplicação industrial. A fonte de carbono poderia ser responsável por 25-45 % dos custos totais de produção. Resíduos agro-industriais são fortes candidatos para este papel, porque esses resíduos possuem algumas das características

desejadas, ou seja, preços baixos e alta disponibilidade. Neste cenário, o glicerol bruto como um subproduto industrial, disponível em grandes quantidades, pode tornar-se ideal para processos fermentativos. O glicerol pode substituir os hidratos de carbono tradicionais, tais como sacarose, glicose e amido, em alguns processos de fermentação industrial (CAMPOS, 2014; XU et al., 2012; ABAD; TURON, 2012; MANTZOURIDOU; NAZIRINI; TSIMIDOU, 2008).

O glicerol bruto contém elementos nutricionais como, fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio, que são utilizados por micro-organismos para o seu crescimento durante processos fermentativos. O glicerol é considerado uma fonte de carbono altamente reduzida e assimilável por bactérias e leveduras sob condições aeróbicas e anaeróbicas para a obtenção de energia metabólica, como regulador do potencial redox e para a reciclagem de fosfato inorgânico dentro da célula (NITAYAVARDHANA; KHANAL, 2011; RIVALDI et al., 2008).

Embora o glicerol tenha sido amplamente utilizado, como única fonte de carbono, na síntese de diversas biomoléculas por linhagens bacterianas, poucas investigações estão presentes na literatura relacionando o emprego desse substrato por micro-organismos eucarióticos. Em Eucariotas, o glicerol pode ser transformado em ácido cítrico (CA), lipídeos de armazenamento e outros produtos (BERNARDINO et al., 2013; CHANG et al., 2013; MAKRI; FAKAS; AGGELIS, 2010; AMARAL et al., 2009; SILVA; MACK; CONTIERO, 2009).

Um exemplo é a utilização do glicerol como substrato de crescimento para culturas de leveduras oleaginosas. Leveduras oleaginosas são fungos unicelulares definidos como tendo pelo menos 20% do seu peso seco constituído por lipídeos. Essas leveduras não só contêm lipídeos na membrana celular, mas também acumulam lipídeos na forma de triacilglicerol. A *Rhodotorula glutinis* é uma levedura oleaginosa que é capaz de ativar os ácidos graxos não esterificados para a síntese de triacilglicerol. Evidências sugerem que estes micro-organismos possuem potencial como fonte de ácidos graxos para a produção de biodiesel (EASTERLING et al., 2009).

Almeida (2010) estudou a otimização do processo fermentativo para a produção de biomassa rica em carotenoides através de *Rhodotorula*. A autora avaliou parâmetros tais como: temperatura de incubação, consumo de glicerol pela levedura, fonte de nitrogênio inicial no meio de fermentação e a concentração da fonte de carbono. Os resultados, obtidos pela autora, demonstraram maior desempenho da levedura em sintetizar biomassa em meios de cultivo contendo 20 g.L<sup>-1</sup> de glicerol incubados a 30 °C. No presente estudo

aproximadamente 90% do glicerol inicial foi consumido pelas leveduras, independentemente da sua origem (P.A. ou bruto).

O glicerol pode também ser utilizado como fonte de carbono por vários fungos e leveduras no que se refere à produção de biomassa e proteínas extracelulares e intracelulares. Outras pesquisas indicam a produção de  $\alpha$ -amilase por *Yarrowia lipolytica* e biomassa e  $\beta$ -caroteno por *Rhodotorula lactosa* (TACCARI et al., 2012; NICOL; MARCHAND; LUBITZ, 2012; MEINICKE, 2008; RIVALDI et al., 2008).

É pertinente apontar, que processos fermentativos com fungos constituem uma alternativa para a utilização do glicerol bruto, uma vez que podem ser facilmente integrados às usinas de biodiesel, devido à sua exigência mínima de operações adicionais em instalações existentes. A biomassa fúngica é rica em proteína, podendo ser formulado e aplicado tanto em alimentação humana quanto animal. Um perfil de aminoácidos equilibrado da biomassa fúngica, juntamente com teores de proteína bruta e lipídios comparados às fontes de proteína de alta qualidade (tais como farinha de peixe e farelo de soja), torna-se uma opção ideal de fonte de proteína para a alimentação animal (NITAYAVARDHANA; KHANAL, 2011). Consideram-se também, como alternativas interessantes para o aproveitamento do glicerol, a sua transformação, via microbiológica, em metabólitos de interesse industrial como biopesticidas, pigmentos, aromas, polímeros, antibióticos e ainda proteínas recombinantes ou em proteínas unicelulares que podem ser utilizadas como concentrado protéico vitamínico na composição de rações animais (TACCARI et al., 2012)

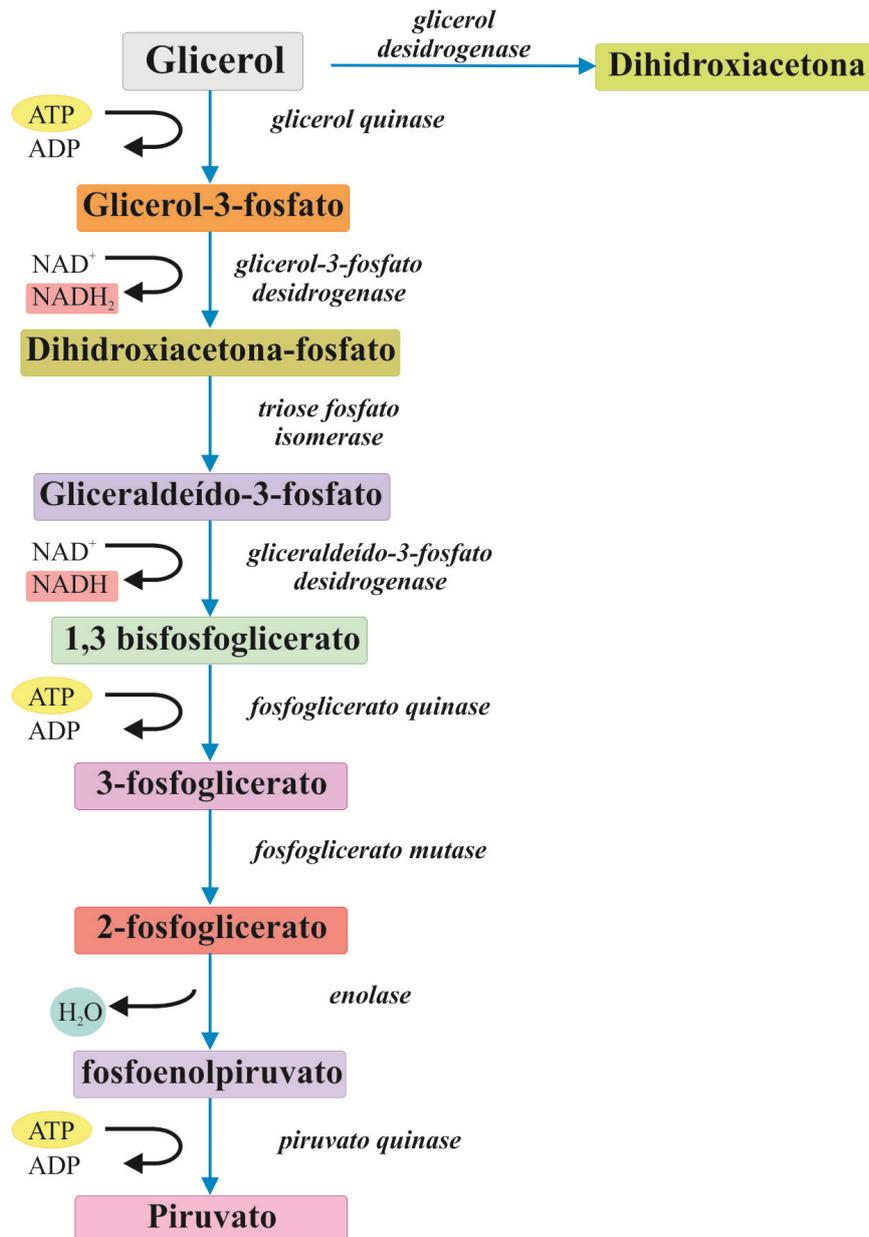
Como anteriormente sinalizado, a partir do momento que o glicerol pode ser utilizado como uma fonte de carbono na microbiologia industrial, este subproduto acrescenta valor à cadeia produtiva do biodiesel, contribuindo para a sua competitividade (SILVA; MACK; CONTIERO, 2009). O investimento em pesquisas para novas aplicações do glicerol se faz necessário antes que maiores problemas ambientais comecem a ocorrer com o aumento na produção do biodiesel. A bioconversão do glicerol permitiria a obtenção de produtos biodegradáveis, contribuiria para reduzir a dependência pelo petróleo com a grande vantagem de utilizar uma fonte renovável. O desenvolvimento de processos para converter o glicerol, um composto de baixo preço, em produtos de alto valor, viria agregar valor ao biodiesel, contribuindo para o desenvolvimento das biorrefinarias (ABAD; TURON, 2012; CHATZIFRAGKOU et al., 2011).

## 2.4 **Bioconversão do Glicerol**

Vários micro-organismos são capazes de metabolizar o glicerol e seu metabolismo tem sido estudado detalhadamente em bactérias como *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Clostridium* e também em leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida glycerinogenes*, *Saccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica* (AMARAL et al., 2009).

Células de leveduras e fungos têm desenvolvido mecanismos adaptativos para controlar os níveis de glicerol em limites adequados para o crescimento. Estes mecanismos incluem a modulação da produção de glicerol e catabolismo, retenção de glicerol intracelular ou a sua liberação para o ambiente extracelular e transporte do glicerol extracelular através da membrana plasmática para dentro da célula. O transporte de glicerol é melhor compreendido em *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levedura controla a retenção de glicerol e libera para o exterior da célula durante osmorregulação através do canal protéico de glicerol da membrana plasmática (KAYINGO et al., 2009).

Segundo Nicol et al. (2012), em células de fungos, é observada a difusão facilitada de glicerol, o ATP normalmente é gasto quando esta molécula é movida para dentro da célula, embora o transporte ativo pareça prevalecer mais nos fungos. Uma vez no interior das células dos fungos, o glicerol é predominantemente catabolizado por fosforilação ou via oxidativa (Figura 3), embora haja evidências de mecanismos alternativos (NICOL; MARCHAND; LUBITZ, 2012; SILVA; MACK; CONTIERO, 2009).



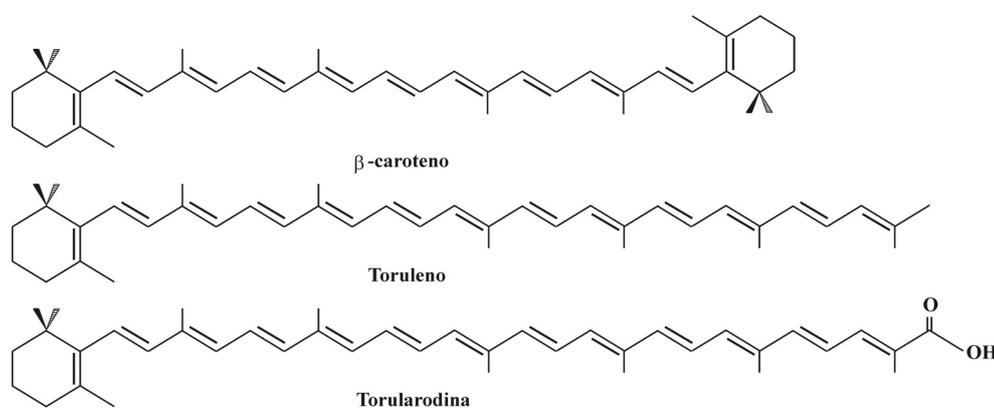
**Figura 3** – Rota metabólica do glicerol via DHA (Dihidroxiacetona) por *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica* e outras leveduras utilizando glicerol como fonte de carbono segundo Wang et al., 2001; Silva; Mack; Contiero, 2009; Amaral et al., 2009; Nicol; Marchand; Lubitz, 2012 (adaptado a partir de Silva, et al., 2009; Bories et al., 1991).

Na via de fosforilação, o glicerol é fosforilado pela enzima glicerol quinase, originando glicerol-3-fosfato. A enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase, em seguida, oxida esta molécula para dihidroxiacetona fosfato. Através da via oxidativa, o glicerol é convertido em dihidroxiacetona e, em seguida, dihidroxiacetona fosfato pelas enzimas glicerol desidrogenase e dihidroxiacetona quinase, respectivamente. A dihidroxiacetona fosfato derivado de cada via pode entrar na via glicolítica ou gliconeogênica onde é ainda metabolizado (NICOL; MARCHAND; LUBITZ, 2012; SILVA; MACK; CONTIERO, 2009).

## 2.5 Carotenoides

Os carotenoides representam um grupo de moléculas importantes para as indústrias farmacêuticas, de medicamentos, cosméticos, alimentos e rações, não somente por atuarem como precursores da vitamina A, mas também como corantes, antioxidantes (possível inibição da atividade tumoral) e pela resposta imune que conduzem a proteção contra infecções bacterianas e fúngicas (ALMANZA et al., 2014; FRENGOVA; BESHKOVA, 2009).

A estrutura dos pigmentos carotenoides é caracterizada por uma cadeia alifática, constituída por um sistema de duplas ligações conjugadas com grupamentos metila (Figura 4). A variação de cor dos carotenoides é devido a pequenas modificações da cadeia principal. Este esqueleto básico pode ser modificado por diferentes rotas, tais como reações de hidrogenação, desidrogenação, ciclização, migração de dupla ligação, encurtamento ou extensão da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de substituintes e oxidação. O sistema de duplas ligações conjugadas confere a estes pigmentos alta reatividade química, podendo ser facilmente isomerizados e oxidados. (ALMANZA et al., 2014; TRÊS et al., 2007; OLIVIER; PALOU, 2000).



**Figura 4** –Fórmula estrutural dos principais pigmentos formados pela levedura do gênero *Rhodotorula*

**Fonte:** Park et al. (2007)

Os carotenoides são sintetizados na natureza a partir de plantas e micro-organismos. Além disso, alguns carotenoides bacterianos podem apresentar 30, 45 ou 50 átomos de carbono, no entanto, a maioria dos carotenoides produzidos por estes micro-organismos apresentam 40 átomos de carbono, com mais de 600 estruturas conhecidas. Dois grupos têm sido apontados como os mais importantes: os carotenos que são formados apenas por carbono e hidrogênio e as xantofilas, que são derivados oxigenados (MAROVA; CERTIK; BREIEROVA, 2011). A abundância de carotenoides na natureza se deve, provavelmente, à sua via biossintética simples, que tem sido demonstrado principalmente em vegetais

superiores, algas microscópicas e em alguns gêneros de bactérias e fungos (KAISER et al., 2007).

Os carotenoides são isoprenoides lipofílicos sintetizados por todos os micro-organismos fotossintéticos (incluindo plantas, algas e cianobactérias), e também por algumas bactérias não-fotossintéticas e fungos. Duas classes de carotenoides são encontradas na natureza: os carotenos, tais como  $\beta$ -caroteno, hidrocarbonetos lineares que podem ser ciclizados em uma ou ambas as extremidades da molécula e os derivados oxigenados de carotenos, como luteína, violaxantina, neoxantina e zeaxantina, denominados xantofilas (VALDUGA et al., 2009). Carotenoides como o  $\beta$ -caroteno, o licopeno, a luteína e a zeaxantina se diferenciam pelos grupamentos terminais, os quais determinam a atividade vitamínica, apresentando diferenças na solubilidade em solventes orgânicos e no potencial de adsorção, o que permite separá-los por partição em solventes e por cromatografia em coluna (TRÊS et al., 2007). Entre os pigmentos, o  $\beta$ -caroteno é o mais conhecido dos carotenoides. A possível ação protetora do  $\beta$ -caroteno contra o câncer é geralmente atribuída ao seu caráter antioxidante, mas os efeitos na regulação de genes também podem estar envolvidos (BHOSALE, 2004).

O  $\beta$ -caroteno contém dois anéis  $\beta$ -ionona, sendo o único capaz de formar duas moléculas de vitamina A, que podem ser utilizadas na alimentação humana ou animal. Além disso, o  $\beta$ -caroteno é usado como antioxidante para reduzir danos celulares ou de tecidos (CHOUDHARI; ANANTHANARAYAN; SINGHAL, 2008; TRÊS et al., 2007).

Os carotenoides são pigmentos naturais responsáveis pelas cores amarela, laranja e vermelho de muitos alimentos, tais como frutas, vegetais, gema de ovo, alguns peixes (salmão e truta) e crustáceos. Estes pigmentos estão amplamente distribuídos na natureza com grande diversidade de estruturas e funções. Além de colorir, os carotenoides possuem atividades biológicas importantes para a indústria farmacêutica, química, de alimentos e de rações, não somente pela sua atividade provitamínica-A, como por sua atividade anticarcinogênica, destacando-se a inibição de doenças onde os radicais livres apresentam papel fundamental, como arteriosclerose, catarata, degeneração macular, esclerose múltipla, câncer, doenças degenerativas e cardiovasculares (VALDUGA et al., 2009; MALDONADE, 2007; AKSU; EREN, 2005; BHOSALE, 2004; SQUINA; MERCADANTE, 2003).

A carotenogênese em muitos organismos é regulada pela luz. No entanto, a intensidade de iluminação varia com o micro-organismo. Independentemente do aumento ou diminuição no tempo de iluminação e/ou intensidade, pode levar a melhorias na produção de carotenoides. Existem dois aspectos para a teoria da foto-indução. A primeira é que as

melhorias da produção volumétrica de carotenoides ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) estão geralmente associadas diretamente com o aumento do crescimento do micro-organismo. Assim, o efeito de iluminação da luz branca sobre o crescimento do micro-organismo desempenha um papel importante como estimulante da produção de carotenoides. O segundo aspecto a ser considerado é que o aumento no acúmulo de carotenoides na célula ( $\text{mg/g}$ ) estão associados com o aumento da atividade das enzimas envolvidas na biossíntese de carotenoides (FRENGOVA; BESHKOVA, 2009).

As propriedades de uma molécula de carotenoide são dependentes da sua estrutura e, portanto, sua química. Em particular, o sistema conjugado de dupla ligação é considerado o fator mais importante em reações de transferência de energia. É esta característica da molécula que permite a extinção do oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) (PETRIK et al., 2013).

A solubilidade dos carotenoides em soluções aquosas é extremamente pobre, com exceção das regiões hidrofóbicas dos sistemas biológicos. No entanto, este sistema é influenciado pelas estruturas, de modo que os diferentes compostos carotenoides vão sendo incorporados de maneira muito diferente nas membranas. A solubilidade é afetada pela presença e natureza de grupos polares substituintes e isomerização cis/trans (PETRIK et al., 2013; YOUNG; LOWE, 2001).

A função dos carotenoides nas leveduras é relacionada a proteção contra a combinação indesejável do oxigênio singlete e a luz visível. A sua ação é para desativar os radicais livres produzidos durante o metabolismo normal das células, tais como oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), hidroxila (-OH), peróxidos e outros oxidantes por um processo no qual a energia é transferida de níveis altos de excitação para uma molécula carotenoide triplete, que pode retornar à base liberando calor. O papel foto-protetor dos carotenoides em leveduras foi avaliado contrastando as respostas ao UV-B das leveduras albinas pigmentadas de ocorrência natural. O estudo foi realizado em diferentes tempos de exposição à radiação UV-B, em vários estágios de crescimento das leveduras, avaliando a produção de carotenoides por foto-indução e o efeito de UV-B para a sobrevivência da levedura. Os resultados mostraram as linhagens pigmentadas são mais tolerantes à radiação do que as albinas e que o aumento do teor de carotenoides durante a fase estacionária de crescimento melhora sobrevivência das leveduras (ALMANZA et al., 2014).

Substâncias naturais são muitas vezes adicionadas a uma grande variedade de alimentos para torná-los mais saudável e mais atraente. Em particular, o  $\beta$ -caroteno tem chamado bastante atenção, não somente pelo fato de ser o precursor da vitamina A, mas também devido ao seu poder antioxidante capaz de reduzir os riscos de câncer e doenças

cardiovasculares (RUBIO; LAGARON, 2011). A indústria de cosméticos e alimentos demonstra um crescente interesse à demanda de pigmentos desta classe devido as suas propriedades antioxidantes. As aplicações mais comuns são como corantes e aditivos alimentares (ABAD; TURON, 2012).

Os pigmentos carotenoides, como  $\beta$ -caroteno e astaxantina possui alta demanda no mercado, apresentando uma ampla variedade de aplicações: como corantes de alimentos, produtos de panificação; como precursores da vitamina A (pró-vitamina A) em alimentos e ração animal; como aditivos para cosméticos, preparações multivitamínicos; e na última década como antioxidantes para reduzir os danos celulares ou tecidos (AKSU; EREN, 2005).

Nas indústrias de alimentos, os carotenoides são utilizados principalmente como corantes, com os objetivos de repor a cor perdida durante o processamento e armazenamento, colorir os alimentos incolores e uniformizar a coloração de alguns produtos alimentícios. A cor é uma propriedade importante dos alimentos. No entanto, diversos fatores como sazonalidade, armazenamento e efeitos de processamento podem alterar a cor de um alimento, o que requer que o fabricante adicione corantes para satisfazer a expectativa dos consumidores. As razões para adicionar corantes a alimentos incluem: reforçar a cor perdida devido à exposição à luz, ao ar, e a extremos de temperatura, umidade e condições de armazenamento; corrigir variações naturais da cor (embora mascarar qualidade inferior seja inaceitável); conferir cor a alimentos incolores; a conferir cor a alimentos “*divertidos*”, como doces festivos; proteger aromas e vitaminas, que podem ser afetados pela luz do sol durante o armazenamento (CARVALHO, 2004). Mais recentemente, com o crescente interesse pela saúde, os carotenoides também têm sido adicionados aos alimentos a fim de enriquecer o produto. São também precursores de muitos compostos químicos importantes, responsáveis pelo aroma de alguns alimentos, fragrâncias de algumas flores, coloração específica e fotoproteção. (VALDUGA et al., 2009).

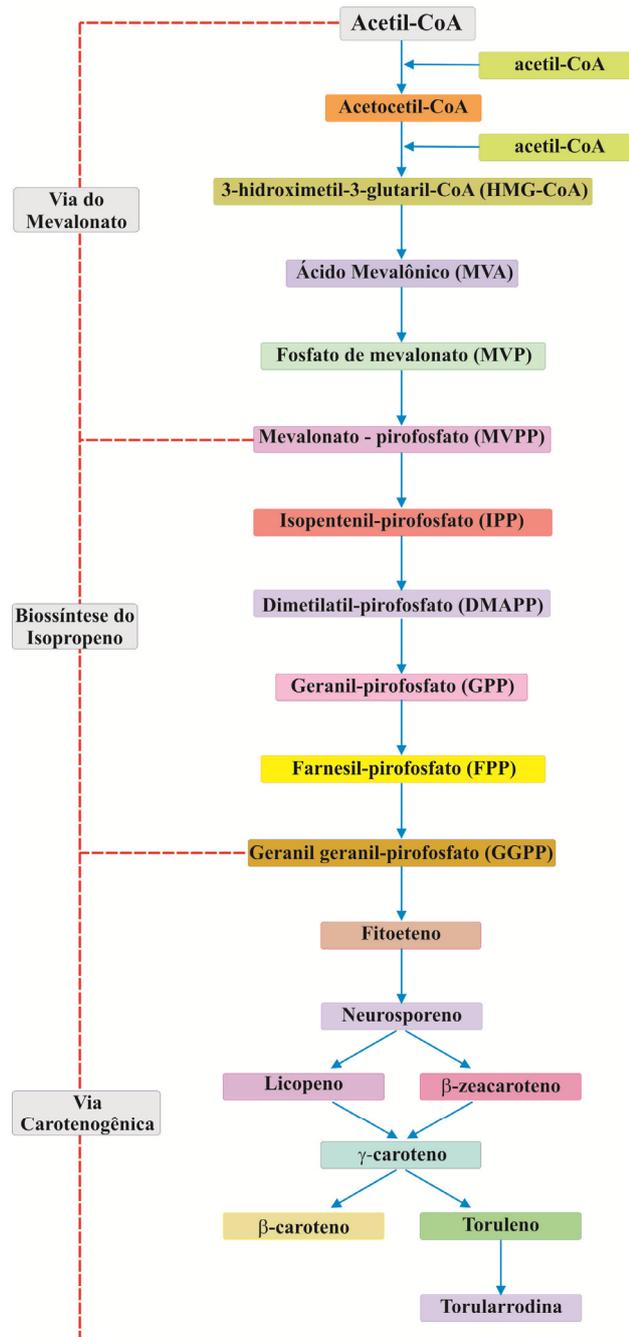
## **2.6 Micro-organismos Produtores de Carotenoides através de Processos Biotecnológicos**

A superprodução de alguns metabólitos, como resposta ao estresse celular, pode tornar-se interessante para biotecnologia. Por exemplo, as leveduras carotenogênicas são conhecidas biotecnologicamente por produzirem pigmentos carotenoides como astaxantina,  $\beta$ -caroteno, toruleno, torularrodina e foi relatado que, sob condições de estresse, esse acúmulo de carotenoides poderia ser aumentado. O conhecimento dos mecanismos moleculares para

estimulação da produção de carotenoides pode ser conduzida a uma melhoria do processo biotecnológico. Leveduras vermelhas são capazes de acumular não apenas carotenoides, mas também ergosterol, ácidos graxos insaturados, coenzima Q10 e outros, que podem contribuir para o enriquecimento da biomassa. A utilização desta biomassa enriquecida na indústria de alimentos pode ter um efeito positivo não apenas em alimentos destinados a animais e peixes, devido ao elevado teor de substâncias fisiologicamente ativas, mas também pode influenciar no valor nutricional e propriedades sensoriais de produtos para a nutrição humana (MAROVA; CERTIK; BREIEROVA, 2011).

Os carotenoides são compostos intracelulares; portanto, para alcançar simultaneamente uma alta concentração de biomassa e carotenoides é fundamental a obtenção de uma elevada produção de  $\beta$ -caroteno. Além da estratégia metabólica, a otimização das condições de fermentação é uma outra maneira de aumentar a produção de carotenoides. A fermentação em batelada é muitas vezes aplicada para a produção de compostos carotenoides. No entanto, para a fermentação em batelada, as condições ambientais ótimas para o crescimento celular e a formação de produto são geralmente bastante diferentes. Assim, a manutenção de uma simples condição ambiental ao longo de um processo fermentativo pode não ser ideal para uma produção máxima de carotenoides (LUO et al. 2013).

Fungos filamentosos, leveduras, bactérias e algas, tais como *Streptomyces chrestomyceticus*, *Blakeslea trispora*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Flavobacterium* sp., *Phaffia* sp., *Rhodotorula* sp. têm sido descritos como micro-organismos produtores de carotenoides. A Figura 5 apresenta a via biossintética, a partir de acetil-CoA, para a produção de  $\beta$ -caroteno, toruleno e torularrodina em espécies de *Rhodotorula*.



**Figura 5** – Via biossintética a partir de acetil-CoA para  $\beta$ -caroteno, toruleno e torularrodina em espécies de *Rhodotorula*

Fonte: Marova, Certik e Breierova (2011).

Em comparação com a extração a partir de vegetais, a produção microbiana de carotenoides é de interesse primordial, pois os pigmentos extraídos de vegetais apresentam problemas de variabilidade sazonal e geográfica na produção e comercialização de vários dos corantes (ALMANZA et al., 2014). Pigmentos microbianos ainda apresentam vantagens em termos de produção em relação aos seus similares extraídos de vegetais ou animais: o desenvolvimento de vegetais superiores é mais lento que o de micro-organismos e algas.

Assim, a produção de pigmentos por bioprocessos envolvendo micro-organismos, cuja velocidade de crescimento é relativamente alta, pode garantir uma produtividade tal que torna a processo vantajoso (CARVALHO, 2004).

Os carotenoides podem ser biossintetizados por micro-organismos fotossintetizantes como, por exemplo, algas e cianobactérias (azuis e verdes), e por micro-organismos não fotossintetizantes, como bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Entre as fontes microbianas de carotenoides, além de algas como espécies *Dunaliella*, leveduras, como *Phaffia rhodozyma* e *Rhodotorula glutinis* são de interesse comercial (AKSU; EREN, 2005). Os animais não são capazes de sintetizar carotenoides e por isso estes pigmentos devem ser adicionados a sua alimentação. Os seres humanos adquirem os carotenoides através de vegetais e frutas. Os produtos podem ser ainda enriquecidos com carotenoides através de aditivos específicos (FRENGOVA; BESHKOVA, 2009).

Em termos de aplicação biotecnológica, fungos e leveduras tem a vantagem de crescer com relativa facilidade em fermentadores e são, portanto, micro-organismos considerados adequados para a produção industrial em larga escala. Vale salientar, que além disso, a biomassa de fungos ou leveduras pode ser diretamente incorporada à ração animal e à alimentação humana, sem a necessidade prévia de procedimentos de extração dos carotenoides contidos nessa biomassa (MAROVA; CERTIK; BREIEROVA, 2011).

Dentre estudos realizados, com a finalidade de maximização e/ou otimização da bioprodução de carotenoides visando à utilização industrial, destacam-se os micro-organismos tais como *Xanthophyllomyces dendrorhous*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporobolomyces* e *Phaffia rhodozyma*, sendo que os carotenoides naturais mais investigados são a astaxantina,  $\beta$ -caroteno, cantaxantina, toruleno e licopeno (VALDUGA et al. 2009).

A produção comercial de carotenoides que utilizam micro-organismos é altamente eficiente, uma vez que as linhagens facilmente se adaptam à diferentes esquemas de tratamento. Vários estudos foram realizados sobre a síntese de carotenoides por micro-organismos selvagens, incluindo a prospecção dessas estirpes, a otimização do meio e condições ambientais, adição de estimuladores e aplicação de stresse oxidativo (LUO et al. 2013).

O acúmulo de pigmentos carotenoides na maioria das leveduras tem início no final da fase logarítmica e continuidade na fase estacionária de crescimento. A presença de uma fonte de carbono adequada é importante para a biossíntese de carotenoides. As leveduras podem sintetizar carotenoides quando cultivadas em meio sintético, contendo diferentes fontes de carbono, como glicose, xilose, celobiose, sacarose, glicerol e sorbitol. Estudos sobre

carotenogênese têm sido direcionados no uso de substratos naturais como fontes de carbono, tais como suco de uva, mostos de uvas, resíduos de mostarda hidrolisada e isolada, hidrolisado hemicelulósico de madeira de *Eucalyptus globulus*; hidrolisado de feijão, caldo de cana-de-açúcar, melaço de cana, xarope de milho, hidrolisado de milho, soro de leite. Nos últimos anos, matérias-primas e subprodutos de origem agroindustriais têm sido propostos como alternativas de baixo custo para a produção de metabólitos microbianos, objetivando minimizar problemas ambientais e energéticos relacionados com a sua eliminação (FRENGOVA; BESHKOVA, 2009).

A produção de carotenoides por fermentação pode tornar-se industrialmente viável, se o custo da produção for minimizado pela utilização de substratos agroindustriais de baixo custo como fontes de nutrientes. Vários pesquisadores têm investigado a produção de carotenoides por diferentes micro-organismos, através de processos fermentativos utilizando vários grãos (aveia, trigo, cevada, milho, arroz, centeio), lipídios e derivados, glicerol, celobiose, melaço de cana, mosto de uvas, e soro de queijo (AKSU; EREN, 2007; AKSU; EREN, 2005; BHOSALE; GRADE, 2001). Entre os gêneros de leveduras capazes de metabolizar o glicerol bruto e sintetizar carotenoides destacam-se *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula* sp. e *Candida* sp. (TACCARI et al., 2012; CHATZIFRAGKOU et al, 2011; MAKRI; FAKAS; AGGELIS, 2010). Algumas microalgas também são capazes de metabolizar o glicerol, demonstrando grande potencial na conversão do glicerol bruto em carotenoides (ABAD; TURON, 2012).

O processo de produção biotecnológica ocorre essencialmente em duas fases: a etapa de fermentação e a recuperação do produto. Para o processo fermentativo, as culturas são produzidas a partir da estirpe original e em seguida utilizada numa fermentação aeróbica submersa para produzir uma biomassa rica em pigmento carotenóide e outros metabólitos como, por exemplo, ergosterol, íons metálicos etc. Em células inteiras a estratégia de isolamento do produto não é necessária e, como já apontado, o produto sob a forma de biomassa, ligeiramente modificado, poderá ser obtido e diretamente utilizado (MAROVA; CERTIK; BREIEROVA, 2011).

O mercado global de carotenoides cresce anualmente 2,3% e, em 2018 espera-se chegar a 1,4 bilhões de dólares. Há um interesse crescente em processos destinados a produzir de forma eficiente estes pigmentos em desenvolvimento. De fato, os carotenoides podem ser facilmente sintetizados quimicamente. No entanto, devido a uma preocupação geral sobre a segurança dos pigmentos sintéticos artificiais, a exploração de carotenoides acumulado por micro-organismos representa uma abordagem mais interessante para a sua produção (CUTZU

et al. 2013). No mercado, as vendas de  $\beta$ -caroteno foram estimados para ultrapassar US \$ 280 milhões em 2015. A maior parte do  $\beta$ -caroteno comercializado no mundo é obtido por síntese química a partir de  $\beta$ -ionona. No entanto, existem alternativas biotecnológicas, utilizando fungos filamentosos, bactérias, microalgas, e leveduras como produtores de pigmentos (MACHADO; BURKERT, 2014; ENRÍQUEZ et al., 2013).

Representando um mercado em expansão de nutracêuticos, os carotenoides tem um mercado global estimado em US\$ 1,2 bilhões em 2015. O  $\beta$ -caroteno representa a maior parcela do mercado de carotenoides avaliado em US\$ 247 milhões em 2007 e com estimativa de US\$ 285 milhões para 2015. Com um mercado em crescimento exponencial como os nutracêuticos, a luteína e a zeaxantina, representantes das xantofilas, são associadas ao tratamento e prevenção da degeneração macular referente à idade, da catarata e da aterosclerose, possuindo também propriedades antioxidantes. O valor de mercado da luteína foi de US\$ 233 milhões em 2010 com uma estimativa de US\$ 309 milhões para 2018 (CHAGAS, 2014).

Os Estados Unidos e a Europa, em conjunto, são responsáveis por importante parte das vendas no mercado global de carotenoides. A empresa DSM Nutritional Products representa o maior produtor mundial de carotenoides sintéticos, a BASF é o segundo produtor e, em conjunto, representam cerca de 55% do mercado mundial de carotenoides (SILVEIRA; OKADA; TAKAKI, 2014).

A síntese de diferentes carotenoides naturais comercialmente importantes ( $\beta$ -caroteno, toruleno, torularrodina e astaxantina) por várias espécies de leveduras pertencentes ao gênero *Rhodotorula* e *Phaffia*, levou a considerar estes micro-organismos como potenciais fontes de pigmentos. As leveduras são mais convenientes do que as algas ou fungos para a produção em larga escala em fermentadores, devido à sua natureza unicelular e elevada taxa de crescimento. *Rhodotorula* sp. e *Xanthophyllomyces dendrorhous* (anteriormente *Phaffia rhodozyma*) tem potencial valor comercial como uma fonte alimentar de carotenoides naturais. No entanto, o alto custo de produção limita a utilização destas leveduras. O custo de produção pode ser reduzido utilizando substratos mais baratos (diferentes matérias-primas agro-industriais), bem como aumentar a produção desses pigmentos pela otimização das condições de cultura (FRENGOVA; BESHKOVA, 2009).

Em função da necessidade de extração dos carotenoides de tecidos e extratos para a purificação de pigmentos, estudos têm sinalizado as alternativas. Uma grande variedade de produtos alimentares contém carotenoides, assim como diferentes genótipos de um organismo ou de um produto. Além disso, podem haver diferenças entre partes do mesmo alimento ou

amostra. Como consequência, não há geralmente um método padrão aceito para a extração de carotenoides. No entanto, a maioria dos métodos de extração segue um caminho comum envolvendo a liberação de componentes desejados a partir de suas matrizes por perturbação do tecido, seguida por remoção dos componentes indesejados e uma extração líquido-líquido ou sólido-líquido. Para os carotenoides, o procedimento mais difundido para recolher estes compostos para posterior análise, é a aplicação de uma etapa utilizando solvente orgânico que extrai esses compostos a partir da matriz. Embora, diferentes solventes orgânicos sejam empregados na extração de carotenoides, a seleção mais apropriada não é fácil. Além das dificuldades anteriores, as diferentes polaridades dos carotenoides existentes, a estrutura da matriz de extração e os seus componentes, também desempenham um papel importante na escolha de um solvente. Normalmente, solventes não-polares, tais como o hexano, são uma boa escolha para carotenoides não-polares ou carotenoides esterificados, enquanto que os solventes polares, tais como etanol e acetona, são mais apropriados para os carotenoides polares (xantofilas). A susceptibilidade dos carotenoides a oxidação deve ser considerada quando se desenvolve um método para a extração de carotenoides. Estas moléculas são relativamente estáveis na matriz, mas os carotenoides em solução podem ser muito sensíveis à luz, calor, ácido ou exposição ao oxigênio (REGAL et al., 2014). Ademais, reforça-se que a extração de carotenoides deve ocorrer sob condições especiais e, deve ser realizada no mais curto espaço de tempo possível, a fim de evitar a exposição à luz, oxigênio, temperaturas elevadas, minimizando-se assim a auto-oxidação e isomerização dos pigmentos (ENRÍQUEZ et al. 2013).

Diante do exposto, a escolha de um sistema de solvente depende do material biológico, do seu pré-tratamento e da composição do carotenoide. As fontes biológicas normalmente contêm uma mistura de carotenoides e, geralmente o método deve ser capaz de extrair uma variedade de carotenoides de polaridade diversificada. A extração deve ser repetida até que todo o pigmento seja liberado da amostra, normalmente três extrações do pigmento são suficientes. Com a amostra reunida no solvente orgânico é, em seguida, concentrada e seca por evaporação rotativa (ECHAVARRI-ERASUN; JOHNSON, 2002). Finalizada a extração, subsequente identificação de carotenoides purificados é realizada por uma sequência de análises incluindo espectroscopia UV/visível, o que proporciona informação valiosa sobre a natureza do cromóforo. Espectroscopia de massa é extremamente útil e indispensável na identificação de carotenoides. Ela proporciona a massa molecular de carotenoides purificados e pode proporcionar muita informação adicional e o padrão de fragmentação do carotenoide de interesse, que é valiosa para a avaliação da pureza e estrutura.

Como anteriormente afirmado, a produção biotecnológica de carotenoides é de crescente interesse, especialmente os carotenoides de origem microbiana. Estudos relatam que a *Rhodotorula glutinis* é considerado um potencial para a produção de carotenoides em grande escala no fermentador, devido à sua elevada taxa de crescimento e baixas necessidades nutricionais (WANG et al., 2008).

Fortes evidências científicas sugerem que estes pigmentos podem ter benefícios potenciais na saúde humana e animal, o que tem aumentado o interesse comercial na sua comercialização. A possibilidade da produção de corantes naturais em escala industrial e o elevado valor dos produtos tornam a produção biotecnológica de carotenoides uma área importante de estudo. A produtividade por bioprocessos em um dado sistema depende das condições nutricionais e físicas da cultura, afetando não somente o crescimento celular como a produção de pigmento. Sendo assim, os micro-organismos acumulam vários tipos de carotenoides como resposta ao estresse das condições ambientais. A composição do meio de cultivo, tais como a fonte de carbono e nitrogênio, presença de metais, sais e agentes químicos, são fatores determinantes para um aumento na produção desses pigmentos. Além disso, as condições ambientais como temperatura, agitação, aeração e pH são de extrema importância (PARK et al., 2005; VALDUGA et al., 2009).

## **2.7 Leveduras do gênero *Rhodotorula***

Utilizando o Agar Sabouraud, culturas de espécies *Rhodotorula* crescem rapidamente a 30 °C. Essas leveduras apresentam cor rosa coral, suave, mucóide e úmida. Espécies de *Rhodotorula* são encontradas no ar, solo e filosfera (superfície das folhas das plantas) (MOLINÉ; LIBKIND; BROOCK, 2012). Além disso, são encontrados em produtos como leite e queijo (ALMANZA et al., 2014; MOLINÉ; LIBKIND; BROOCK, 2012).

Leveduras do gênero *Rhodotorula* são micro-organismos estritamente aeróbios com características metabólicas peculiares, como a capacidade de produção de glicogênio durante a fase de crescimento exponencial e também produção de grandes quantidades de lipídios e pigmentos carotenoides durante a fase estacionária de crescimento (ALMANZA et al., 2014). Estes micro-organismos são capazes de produzir carotenoides tais como,  $\beta$ -caroteno, toruleno e torularrodina em várias proporções. Durante a biossíntese de pigmentos,  $\gamma$ -caroteno atua como uma ramificação do carotenoide, a partir do qual a hidrogenação conduz à formação  $\beta$ -

caroteno, enquanto que a hidroxilação seguido de carboxilação leva à formação de toruleno e torularrodina, respectivamente (AKSU; EREN, 2005; BHOSALE; GRADE, 2001).

O gênero *Rhodotorula* refere-se a um grande grupo de leveduras pigmentadas esporogênicas pertencentes ao filo *Basidiomycota*, classe *Urediniomycetes* e ordem *Sporodiales*. (ALMANZA et al., 2014). A maioria das espécies *Rhodotorula* produz diferentes tipos de pigmentos carotenoides, quatro dos quais foram identificados em quase todas as espécies: torularrodina (Ácido 3', 4'-Dideidro- $\beta$ ,  $\gamma$ -caroteno 16'-oico), toruleno (3', 4'-Dideidro- $\beta$ ,  $\gamma$ -caroteno),  $\gamma$ -caroteno ( $\beta$ ,  $\gamma$ -caroteno), e  $\beta$ -caroteno ( $\beta$ ,  $\beta$ -caroteno). Os pigmentos são sintetizados pela via Melavonato. Ácido mevalônico é transformado em unidades de pirofosfato de isopentenilo e, em seguida, condensado de modo a formar sucessivamente o fitoeno. Uma transformação sucessiva do fitoeno leva a formação de cada um dos pigmentos acima mencionados. A proporção de cada carotenoide depende da linhagem e das condições de cultivo (MOLINÉ; LIBKIND; BROOCK, 2012). A torularrodina é biossintetizada através do  $\gamma$ -caroteno, que é um precursor do  $\beta$ -caroteno. Esta levedura varia as taxas de produção dos dois tipos de carotenoides dependendo das condições de incubação e a produção de torularrodina é induzida em condições de estresse oxidativo (SAKAKI et al., 2000).

Produção de carotenoides por leveduras do gênero *Rhodotorula* tem vantagens em relação a outros micro-organismos, tais como algas e outros fungos. A taxa de crescimento é elevada e grande quantidade de biomassa celular é relativamente fácil de ser obtida no laboratório e em escala piloto. As células podem ser cultivadas em biorreatores convencionais e a biomassa pode ser utilizada diretamente como alimentação ou como aditivo em produtos farmacêuticos. Além disso, as leveduras podem adaptar-se a diferentes condições ambientais e crescer sob uma grande variedade de fontes de carbono e nitrogênio (MOLINÉ; LIBKIND; BROOCK, 2012).

O gênero *Rhodotorula* também é estudado quanto ao seu potencial como fonte de lipídeos e proteínas unicelulares. A biomassa das leveduras, considerada uma fonte rica em proteínas, pode ser utilizada como alimento para animais após extração dos pigmentos (BHOSALE; GRADE, 2001). A importância da *Rhodotorula glutinis* é conhecida devido ao seu potencial em produzir  $\beta$ -caroteno, uma vez que várias matérias-primas agrícolas baratas podem ser utilizadas como fonte de carbono (YEN; ZHANG, 2011). A *Rhodotorula mucilaginosa* também é uma levedura produtora de carotenoides e sintetiza  $\beta$ -caroteno como principal pigmento (AKSU; EREN, 2005).

Leveduras oleaginosas como a *Rhodotorula glutinis* têm a capacidade de crescer e acumular lipídeos quando cultivadas em glicerol, com tempo de geração curto e requisitos

mínimos de nutrientes. Enquanto o glicerol purificado tem muitos usos possíveis, o glicerol bruto produzido durante a fabricação do biodiesel contém macroelementos, tais como o cálcio, potássio, magnésio, enxofre e sódio que pode ser utilizado como substrato para obtenção do produto desejado proporcionando vantagem adicional de compensação de custos de produção (EASTERLING et al., 2009). Por exemplo, a levedura oleaginosa *Rhodotorula graminis* tem sido estudada como um bioprodutor de compostos lipídicos e carotenoides utilizando alguns resíduos, incluindo o glicerol bruto. Vários tipos de leveduras carotenogênicas (principalmente do gênero *Rhodotorula*) podem ser utilizados para a conversão do glicerol em diversos tipos de metabólitos de alto valor agregado. Essas leveduras podem assimilar várias fontes de carbono, tais como glicose, xilose, celobiose, sacarose, glicerol, sorbitol, etc., e assim vários resíduos podem ser utilizados como substrato de baixo custo na preparação do meio de cultivo (PETRIK et al., 2013). Espécies de *Rhodotorula* cultivada em MMS (Metil Metano Sulfonato) produz torularrodina como um importante pigmento carotenoide, que compreende entre 60-80% do total de carotenoides;  $\beta$ -caroteno representa 10-20% de carotenoides totais e o toruleno geralmente está presente em proporções menores. Torularrodina é o pigmento que possui o estado de oxidação mais elevado e é a molécula mais polar do que outros pigmentos semelhantes. Este pigmento aparece primeiro no espectro de absorção seguido por toruleno e  $\beta$ -caroteno (MOLINÉ; LIBKIND; BROOCK, 2012).

O cultivo de *Rhodotorula glutinis* é afetado por parâmetros ambientais durante o processo fermentativo. Para melhorar o desempenho e, conseqüentemente, reduzir o custo dos processos biotecnológicos, vários estudos têm sido realizados para otimizar as condições de cultura, incluindo os fatores físicos e nutricionais. Tais como a natureza e concentração de fontes de carbono e nitrogênio, minerais, vitaminas, pH, aeração, temperatura, luz, estresse, irradiação, microfiltração e a agitação que têm uma maior influência sobre o crescimento e produção de células. O stress nos tecidos biológicos é conhecido por produzir uma resposta bioquímica envolvendo um aumento na atividade de enzimas e nos níveis de carotenoides quando eles são cultivados em condições desfavoráveis. Metais como o potássio, por exemplo, tem função nos micro-organismos de estabilização estrutural de ribossomos, que estão associados com uma grande fração de  $K^+$  intracelular e ( $Mg^{2+}$ ) em bactérias, mas também estão associados com a ativação de diversas enzimas microbianas. Várias fontes de carbono e nitrogênio para cultivo de *Rhodotorula*, incluindo o mosto de uva, xarope de glicose, melão de beterraba, farelo de soja, extrato de farinha de milho, extrato, melão de cana-de-açúcar e de soro de leite ultrafiltrado foram estudados com a finalidade de

desenvolver um meio de cultura capaz de gerar uma quantidade máxima do produto desejado, além de ser econômico (ALMANZA et al., 2014; YEN; YANG, 2012).



**Tabela 2** – Micro-organismos empregados nos ensaios de seleção para avaliar a produção de carotenoides

LEVEDURAS		ORIGEM		EMBRAPA CNPAT	
Nome	Instituição	Código		Código	
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Micoteca UFPE	URM 3961		-	
<i>R. glutinis</i>	Micoteca UFPE	URM 5724		CMIAT 160	
<i>R. glutinis</i>	Micoteca UFPE	URM 1348		-	
<i>R. rubra</i>	Micoteca UFPE	URM 5183		CMIAT 167	
<i>R. aurantiaca</i>	Micoteca UFPE	URM 5726		CMIAT 161	
<i>R. minuta</i>	Micoteca UFPE	URM 5185		CMIAT 166	
<i>R. lactosa</i>	FAT	CCT 2057		CMIAT 165	
<i>R. rubra</i>	FAT	CCT 5470		-	

FAT: Fundação André Tosello

Nos experimentos realizados em Erlenmeyers de 2L e biorreatores (itens 3.5.3 e 3.5.4), além da linhagem previamente selecionada, foi incorporada uma linhagem pertencente à Coleção de Culturas do Laboratório de Processos Agroindustriais da Embrapa Agroindústria Tropical, designada inicialmente como *Rhodotorula* sp. CMIAT 164. O item subsequente (3.1.2) descreve em detalhes os procedimentos de identificação do referido micro-organismo.

### 3.1.2. Identificação de *Rhodotorula* sp CMIAT 164

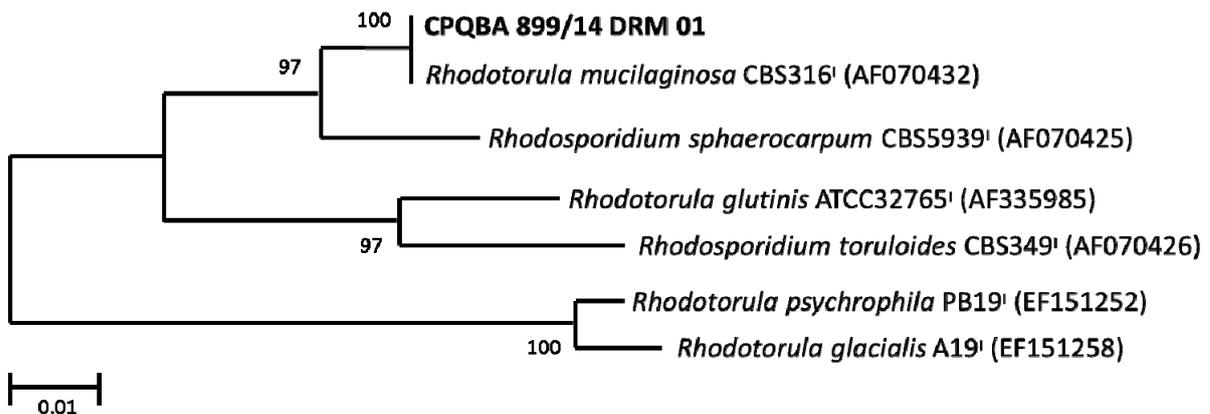
A levedura empregada nos ensaios de aumento volumétrico e em biorreatores, previamente denominada *Rhodotorula* sp. CMIAT 164, foi encaminhada ao CPQBA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícola/Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP) para identificação. A identificação foi realizada por sequenciamento e análise filogenética de fragmentos de genes do *operon* ribossomal. O protocolo empregado pelo CPQBA é descrito a seguir. O DNA genômico da amostra foi extraído como descrito em Scherer; Stevens (1987). A amplificação da região D1/D2 (DNA<sub>r</sub> 26S) foi realizada pela metodologia PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando como molde o DNA genômico extraído diretamente da amostra. Os *primers* (oligonucleotídeos sintéticos) utilizados para a reação de PCR foram NL-1m e NL-4m homólogos às extremidades da região D1/D2. Os fragmentos amplificados foram então purificados e submetidos diretamente ao sequenciamento em sequenciador automático AB13500XL Series (*Applied Biosystem*). As sequências parciais das regiões D1/D2 obtidas com os diferentes *primers* foram montadas em um *coting* (sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparadas com as sequências de organismos representados nas bases de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As sequências foram alinhadas empregando o programa CLUSTAL X (Thompson et al., 1994) e as análises filogenéticas foram conduzidas utilizando

o programa MEGA versão 4.0 (Tamura et al., 2007). As matrizes de distância evolutiva foram calculadas com o modelo de Kimura (1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de *Neighbor-Joining* (Saitou e Nei, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 re-amostragens, utilizando o software de rotina incluído no programa MEGA 4.0.

A sequência de DNA da região D1/D2 da amostra CPQBA899/14DRM-01 esta apresentada abaixo:

CGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCCTAGTAGCGGCGAGCGAAGCGGGAAGAGCTCAAATT  
TATAATCTGGCACCTTCGGTGTCCGAGTTGTAATCTCTAGAAATGTTTTCCGCGTTGGACCGCACAC  
AAGTCTGTTGGAATACAGCGGCATAGTGGTGAGACCCCGTATATGGTGCGGACGCCAGCGCTTT  
GTGATACATTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATTGGGTGGTAAATTCCATCT  
AAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTT  
TGAAAGAGAGTTAACAGTACGTGAAATTGTTGGAAGGGAAACGCTTGAAGTCAGACTTGCTTGC  
CGAGCAATCGGTTTGCAGGCCAGCATCAGTTTTCCGGGATGGATAATGGTAGAGAGAAGGTAGCA  
GTTTCGGCTGTGTTATAGCTCTCTGCTGGATACATCTTGGGGGACTGAGGAACGCAGTGTGCCTTTG  
GCGGGGGTTTCGACCTCTTCACACTTAGGATGCTGGTGGAAATGGCTTTAAACGACCCGTCTTGA

A árvore filogenética construída a partir das sequências recuperadas da base de dados do GenBank e da amostra CPQBA899/14DRM-01 está representado na Figura 7.



**Figura 7** – Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre a sequência parcial do gene RNA ribossomal 26S da amostra CPQBA899/14DRM-01 e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados GenBank.

De acordo com a análise da sequência de DNA da região D1/D2 e a árvore filogenética, a levedura foi identificada como *Rhodotorula mucilaginosa* (A. Jörg.) F.C. Harrison 1928. A sequência parcial da região D1/D2 do DNA<sub>r</sub> 28S da amostra CPQBA899/14DRM-01 apresentou 100% de similaridade com as sequências da mesma região do *operon* ribossomal de diferentes linhagens de *Rhodotorula mucilaginosa*

depositadas no banco de dados GenBank e no banco de dados do CBS. Na árvore filogenética apresentada na Figura 7, a amostra CPQBA899/14DRM-01 formou um agrupamento consistente (100% de *bootstrap*) com representantes de *Rhodotorula mucilaginosa*.

### 3.2 Características do glicerol P.A e glicerol bruto

O glicerol bruto empregado nos experimentos foi procedente da cadeia produtiva do biodiesel de soja por rota metílica, realizada na Usina de Biodiesel de Quixadá-CE (UBQ) (ANEXO A). A coleta do glicerol bruto foi realizada por técnicos da Petrobras (Petróleo Brasileiro S/A), sendo imediatamente transportado para o Laboratório de Bioprocessos da Embrapa Agroindústria Tropical. O glicerol bruto foi armazenado em recipientes plásticos e estocado em temperatura ambiente (em torno de  $25 \pm 1$  °C). Tomou-se o cuidado de coletar um volume de glicerol bruto suficiente para todo o estudo, de modo a garantir a mesma composição do meio em todos os experimentos. A glicerina empregada nos processos fermentativos foi o glicerol P.A (bidestilada com 99,5% de pureza) da marca Proquímios.

### 3.3 Meios de Cultivo

A Tabela 3 sintetiza a composição dos diferentes meios de cultivo utilizados na execução do trabalho de pesquisa. Nos itens 3.3.1 a 3.3.4 serão descritos os procedimentos de preparação desses meios, bem como, sinalizadas brevemente as etapas experimentais nas quais tais meios foram empregados.

**Tabela 3** – Composição dos principais meios utilizados nos experimentos

Componentes	Composição (g.L <sup>-1</sup> )					
	Agar Sabouraud	Sabouraud original	Sabouraud Modificado	Meio de propagação (Almeida, 2010)	Extrato de Malte (EM) modificado	Meio otimizado (Almeida, 2010)
Peptona de soja	10,0	10,0	10,0	-	-	-
Peptona de carne	-	-	-	-	5,0	-
Extrato de malte	-	-	-	-	3,0	-
Extrato de levedura	-	-	-	1,0	3,0	1,0
Dextrose	40,0	20,0	-	-	-	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	-	-	1,0	-	1,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	5,0	-	5,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-	-	-	0,5	-	0,5
Agar	15,0	-	-	-	-	-
Glicerol	-	-	10,0 (P.A)	20,0 (P.A)	10,0 (P.A)	20,0 (P.A. ou bruto)

### 3.3.1 Meio de manutenção

Para a preparação do meio de manutenção (Agar Sabouraud) foram utilizados 10 g.L<sup>-1</sup> de peptona de soja, 40 g.L<sup>-1</sup> de dextrose e 15 g.L<sup>-1</sup> de agar. Após a solubilização dos reagentes, 7 mL desse meio foram adicionados em tubos rosqueáveis com capacidade de 20 mL. Em seguida, os tubos contendo o ágar Sabouraud foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos. Após a esterilização, os tubos foram resfriados na posição inclinada até a completa solidificação do meio.

### 3.3.2 Meios de ativação e propagação do inóculo

A ativação da levedura foi realizada em Agar Sabouraud (meio de manutenção descrito no item anterior). A propagação foi conduzida em meio Sabouraud original, meio Sabouraud modificado ou em meio de propagação (ALMEIDA, 2010), dependendo da etapa experimental (detalhes apontados no item 3.4). Na preparação do meio Sabouraud original foram empregados 10 g.L<sup>-1</sup> de peptona de soja e 20 g.L<sup>-1</sup> de dextrose e no Sabouraud modificado, 10 g.L<sup>-1</sup> de peptona de soja e 20 g.L<sup>-1</sup> de glicerol P.A (bidestilado com 99,5% de pureza). No meio Sabouraud modificado, a glicose (fonte de carbono original) foi substituída por glicerol P.A (fonte de carbono alternativa). O meio de propagação, conforme Almeida (2010), apresentava a seguinte composição, em g.L<sup>-1</sup>: 20,0 de glicerol P.A; 1,0 de extrato de levedura; 1,0 de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 5,0 de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 0,5 de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. Todos os meios supracitados seguiram o mesmo protocolo de preparação. Após a solubilização dos componentes em água destilada, alíquotas de 100 mL (de cada meio) foram distribuídas em Erlenmeyers com capacidade de 250 mL, que em seguida, foram vedados com rolha de algodão e, por fim, esterilizados a 121 °C por 15 minutos.

### 3.3.3 Meios de fermentação dos micro-organismos

Para a etapa de seleção empregou-se o meio Extrato de Malte (EM) modificado, no qual a glicose foi substituída pelo glicerol PA (bidestilado com 99,5% de pureza) como fonte de carbono. A composição final do meio em g.L<sup>-1</sup> foi: 3,0 de extrato de malte, 3,0 de extrato de levedura, 5,0 de peptona e 10,0 de glicerol P.A. Já para os testes de seleção em meio otimizado contendo glicerol, ensaios de ampliação volumétrica e biorreatores, empregou-se meio de fermentação descrito por Almeida (2010). A composição do meio em g.L<sup>-1</sup> foi: 20,0 de glicerol P.A ou bruto; 1,0 de extrato de levedura; 1,0 de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 5,0 de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 0,5

de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . O pH inicial dos meios de fermentação foi ajustado em torno de 6,5 utilizando hidróxido de sódio 1%. Por fim, os meios foram esterilizados a 121 °C por 15 minutos (ensaios em Erlenmeyers de 250 mL e 2 L) e a 121 °C por 30 minutos (ensaios em biorreatores de bancada).

### **3.3.4 Meios de alimentação do biorreator**

Nos testes em batelada alimentada foram empregados dois meios de cultura distintos, denominados FCC (fonte de carbono concentrada) e MCC (meio de cultivo concentrado). Os meios de alimentação apresentaram composição semelhante à descrita por Almeida (2010): glicerol bruto; extrato de levedura;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . No entanto, em concentrações alteradas. No meio FCC somente a fonte carbono foi concentrada e apresentou a seguinte composição em  $\text{g.L}^{-1}$ : 64,0 de glicerol bruto; 1,0 de extrato de levedura; 1,0 de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 5,0 de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e 0,5 de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . No meio MCC, todos os constituintes do meio foram concentrados e apresentou a seguinte composição em  $\text{g.L}^{-1}$ : 64,0 de glicerol bruto; 3,2 de extrato de levedura; 3,2 de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 16,0 de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e 1,6 de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Após a diluição dos nutrientes, 700 mL do meio foram adicionados em frascos de reagentes dotados de sistema de bombeamento de meio de cultivo e esterilizados a 121 °C por 15 minutos.

## **3.4 Ativação e Preparo do Inóculo para os Experimentos**

As etapas de ativação e preparo do inóculo para os experimentos foram validadas previamente por testes de reprodutibilidade. Tais testes visaram à padronização da quantidade de inóculo empregada nos ensaios, garantindo assim maior confiabilidade nos resultados experimentais. Os testes de reprodutibilidade consistiram em execuções seguidas dos procedimentos de ativação e preparo de inóculo durante dois dias consecutivos, totalizando cinco execuções diárias para cada linhagem. O meio foi então incubado em shaker orbital a  $30 \pm 1$  °C e 150 rpm por 24 horas. Após o período de incubação quantificou-se espectrofotometricamente a biomassa produzida.

A ativação e preparo de inóculo para os experimentos foram estabelecidos da seguinte forma: **a)** para os testes preliminares de seleção (EM), testes de seleção em meio otimizado contendo glicerol e testes em Erlenmeyers de 2 L, a ativação e propagação ocorreram em agar Sabouraud e em meio Sabouraud original, respectivamente; **b)** para os testes realizados em

biorreatores de bancada, a ativação e propagação do inóculo foram etapas sequenciais e ocorreram da seguinte forma: agar Sabouraud (ativação), meio Sabouraud modificado (propagação) e meio com glicerol P.A (propagação) (Fluxograma apresentado na Figura 8, item 3.5.4.6). Estabeleceu-se o meio Sabouraud modificado como meio de propagação para os testes em biorreator, mediante testes comparativos realizados com *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 (ANEXO B). A finalidade dessa mudança no procedimento de propagação foi propiciar a aclimatização das culturas ao glicerol ao longo do processo fermentativo.

### **3.5 Etapas Experimentais**

#### **3.5.1 Testes preliminares de seleção dos micro-organismos em meio Extrato de Malte (EM) modificado contendo glicerol P.A**

Inicialmente as leveduras *Rhodotorula lactosa* CCT 2057, *R. rubra* CCT 5470, *R. glutinis* URM 3961, *R. glutinis* URM 5724, *R. glutinis* URM 1348, *R. rubra* URM 5183, *R. aurantiaca* URM 5726 e *R. minuta* URM 5185 foram avaliadas quanto ao potencial de produção de pigmentos carotenoides em meio *Extrato de Malte* (EM) modificado. Os testes ocorreram em shaker orbital utilizando Erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de meio reacional e, ocorreram a  $30 \pm 1$  °C e 150 rpm por 120 horas. Nesta etapa, o teor de carotenoides foi correlacionado pela determinação da cor instrumental, através do parâmetro  $a^*$  a cada 24 horas, conforme análise descrita no item 3.6.3.

#### **3.5.2 Testes de seleção em meio otimizado contendo glicerol P.A**

Esta etapa da investigação consistiu em avaliar a produção de pigmentos em meio otimizado com glicerol P.A como descrito por Almeida (2010). Nesta etapa foram empregadas as leveduras com melhor desempenho na etapa anterior e todos os experimentos foram realizados em Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio de cultivo. Determinou-se a cada 24 horas, a cor instrumental, o consumo de glicerol e a produção de biomassa durante 240 horas de fermentação. Os ensaios ocorreram a  $30 \pm 1$  °C e 150 rpm.

### **3.5.3 Testes em Erlenmeyers de 2 L: comparação entre o desempenho do glicerol P.A e bruto**

Os ensaios iniciais de aumento volumétrico dos meios de fermentação, ocorreram em Erlenmeyers de 2 L contendo 400 mL de meio de cultivo, inoculados com 100 mL de caldo Sabouraud original (500 mL volume final). Nos experimentos foram utilizadas *Rhodotorula aurantiaca* URM 5726 e *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164. Esta última foi incorporada ao trabalho de investigação após alcançar bons resultados em estudos conduzidos por Branco (2010) e Almeida (2010). Os testes visaram à comparação de dois tipos de glicerol: um de grau analítico (bidestilado com 99,5% de pureza) e um proveniente da cadeia produtiva do biodiesel de soja com 80,9% de pureza (glicerol bruto). Após a inoculação do meio, os Erlenmeyers foram incubados em shaker orbital a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  e 150 rpm durante 240 horas. Alíquotas foram retiradas a cada 24 horas para as análises de concentração de biomassa, cor instrumental e consumo de glicerol.

### **3.5.4 Fermentação em biorreator de bancada: avaliação dos parâmetros do processo fermentativo**

Após a finalização das etapas experimentais anteriores (seleção e adaptação das linhagens), iniciaram-se os testes piloto. O biorreator empregado nos ensaios foi da marca New Brunswinck Scientific Co., modelo BioFlo 115 com capacidade nominal de 3,0 L e volume máximo de trabalho de 2,0 L. Com a finalidade de melhorar a agitação do meio reacional foram utilizados impelidores do tipo “Rushton” dotados de 6 pás planas. O espaçamento entre as turbinas foi calculado de acordo com o volume de trabalho. O impelidor inferior foi posicionado a 17,0 cm da tampa ao eixo e o superior a 10,2 cm da tampa ao eixo da unidade de agitação. Foram utilizados quatro defletores equidistantes posicionados a  $90^\circ$  em relação à parede da dorna. A dorna foi alimentada por ar comprimido seco, filtrado na entrada e saída do meio através de filtros (em PTFE com porosidade de  $0,20 \mu\text{m}$ ) para remoção de partículas. A água para manutenção das condições de fermentação foi alimentada por um Chiller Thermo Scientific, modelo Thermo Flex 1400 a  $10^\circ\text{C}$ .

O meio de fermentação foi preparado diretamente na dorna. Para o acompanhamento do pH durante o processo fermentativo foi inserido um sensor antes da esterilização da dorna. Adicionou-se ao meio de cultivo óleo de soja comercial (0,30% v/v) como agente

antiespumante. O meio preparado no biorreator foi esterilizado em autoclave *Phoenix*, modelo AV-150 a 121 °C durante 30 minutos.

Com o sistema (aeração, temperatura e agitação) estável, o fermentador foi inoculado, assepticamente com o auxílio de uma seringa de 60 mL de capacidade dotada de agulha hipodérmica de 1,20 x 40 mm. As fermentações foram conduzidas durante 240 horas em regime de batelada simples ou alimentada, dependendo da etapa experimental. A pureza dos cultivos foi monitorada pelo método de Gram. A seguir são descritos, em detalhes, os testes pilotos realizados em biorreator:

#### 3.5.4.1 *Influência do tempo de propagação dos inóculos das leveduras carotenogênicas*

Os testes iniciais em biorreator consistiram em avaliar a influência da idade do inóculo na produção de biomassa e pigmentos por *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 e *Rhodotorula aurantiaca* URM 5726. Os biorreatores foram inoculados com leveduras em fase exponencial de crescimento (inóculo proveniente de cultivo de 48 horas de propagação) e com leveduras em fase estacionária (inóculo proveniente de cultivo de 120 horas de propagação). O processo fermentativo iniciou-se com a transferência do inóculo para Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de caldo Sabouraud modificado (meio de ativação). Após 24 horas de incubação em shaker orbital a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  e 150 rpm, o meio fermentado (100 mL) foi utilizado para inocular Erlenmeyers de 2 L contendo 400 mL de meio com glicerol puro. Em seguida, os meios foram incubados novamente em shaker orbital a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ , 150 rpm por 48 e 120 horas. Por fim, os reatores contendo aproximadamente 2 L de meio de cultivo foram inoculados com uma suspensão inicial de  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  de massa seca e o processo fermentativo conduzido a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ , 150 rpm e 1vvm durante 240 h. Amostras foram retiradas em intervalos de 24 horas para determinações analíticas (biomassa, pH e consumo de glicerol).

#### 3.5.4.2 *Influência da temperatura sobre a levedura carotenogênica*

A fim de avaliar a influência da temperatura sobre a produção de pigmentos carotenoides durante os processos fermentativos, diferentes temperaturas de incubação foram testadas: 10, 15, 20, 25, 30 °C. Nesta etapa empregou-se a linhagem *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164, uma vez que esta linhagem apresentou resultados mais promissores na fase anterior. A concentração inicial do inóculo foi de  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  de massa seca

obtida previamente por 48 horas de propagação. O processo fermentativo foi conduzido em batelada simples a 150 rpm e 1vvm, com duração de 240 horas. Amostras foram retiradas em intervalos de 24 horas para determinações analíticas (biomassa, pH e consumo de glicerol). O teor de carotenoides foi determinado a cada 24 horas a partir de 120 horas do processo fermentativo.

#### 3.5.4.3 *Influência do pH sobre a levedura carotenogênica*

Esta etapa do trabalho consistiu em avaliar a produção de biomassa, consumo de glicerol e carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 em função do controle de diferentes pHs do meio de fermentação, avaliando os seguintes valores de pH: 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0. Durante o processo fermentativo os valores de pH foram mantidos constante, pela adição de NaOH (0,5 ou 1% m/v) ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1% v/v). A concentração inicial do inóculo foi de 0,1 g.L<sup>-1</sup> de massa seca obtida previamente por 48 horas de propagação e o processo fermentativo foi conduzido em batelada simples a 30 °C, 150 rpm e 1vvm, com duração de 240 horas. Amostras foram retiradas em intervalos de 24 horas para determinações analíticas (biomassa e consumo de glicerol). O teor de carotenoides foi determinado a cada 24 horas a partir de 120 horas do processo fermentativo.

#### 3.5.4.4 *Influência do aumento da concentração inicial do inóculo de Rhodotrula mucilaginosa CMIAT 164*

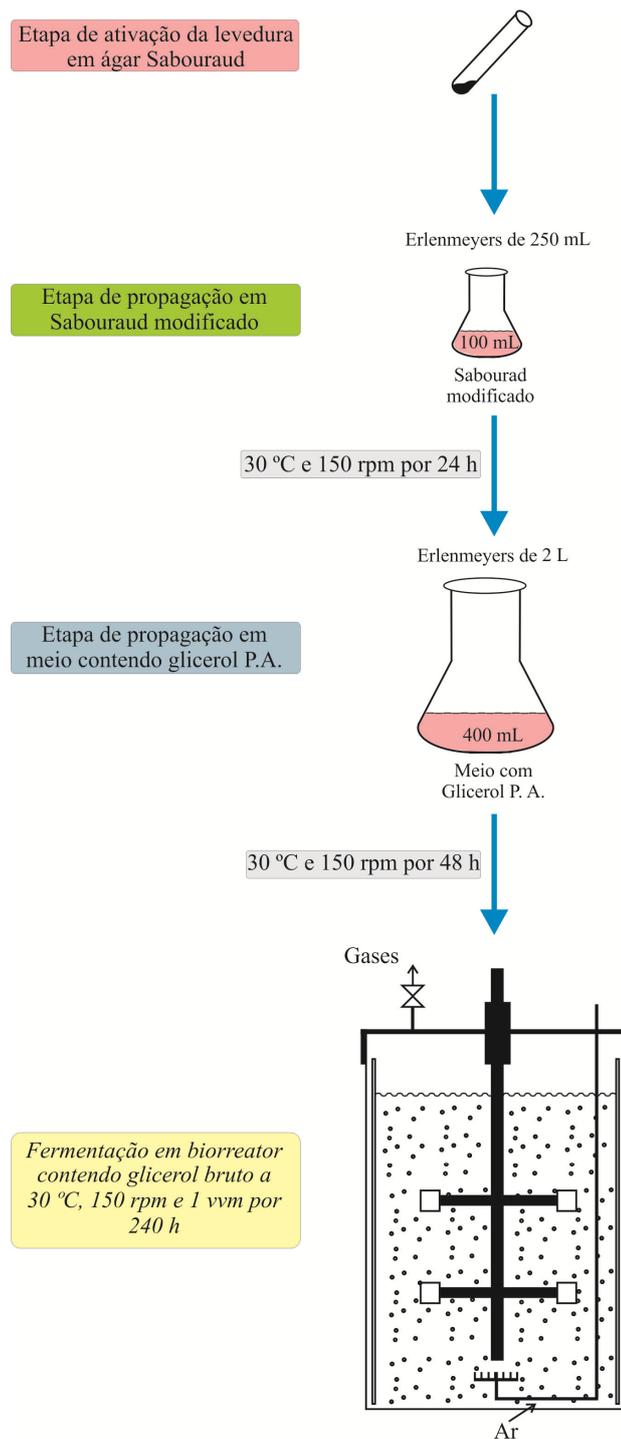
Foram empregados em todas as etapas experimentais um volume inicial de inóculo de 0,1 g.L<sup>-1</sup> de massa seca. Porém, nesta etapa especificamente, foi investigado o impacto do aumento da concentração inicial de inóculo de *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 sobre a produção de carotenoides. Concentrações em torno de 2,0 g.L<sup>-1</sup> de massa seca de levedura foram empregadas nos testes. O processo fermentativo foi conduzido em batelada simples, a 30 °C, 150 rpm e 1vvm durante 240 horas. O pH do processo foi controlado (pH 6). Amostras foram retiradas em intervalos de 24 horas para determinações analíticas (biomassa e consumo de glicerol). O teor de carotenoides foi determinado a cada 24 horas a partir de 120 horas do processo fermentativo.

#### 3.5.4.5 Testes preliminares de alimentação do biorreator

Ensaio em batelada alimentada foram executados para avaliar a produção de carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164. Dois diferentes meios de alimentação do biorreator foram avaliados, o meio FCC e MCC de acordo com item (3.3.4). A alimentação iniciou-se no final da fase exponencial de crescimento da levedura carotenogênica (96 horas de processo) e prolongou-se por quatro dias (192 horas de fermentação). A dorna foi alimentada com um volume de 125 mL.dia<sup>-1</sup>. O processo fermentativo foi conduzido a 30 ± 1°C, 150 rpm e 1vvm durante 240 h. Os biorreatores foram inoculados com uma suspensão inicial de 0,1 g.L<sup>-1</sup> de massa seca de levedura. Amostras foram retiradas em intervalos de 24 horas para determinações analíticas (biomassa e consumo de glicerol). O teor de carotenoides foi determinado a cada 24 horas a partir de 120 horas do processo fermentativo.

### 3.5.4.6 Fluxograma geral dos testes em biorreator

Os testes em biorreator podem ser melhor visualizados pelo fluxograma representado na Figura 8. O fluxograma elaborado demonstra desde a etapa de ativação da levedura até a inoculação em biorreator de 3L.



**Figura 8** – Processo de ampliação volumétrica até biorreator de bancada utilizando glicerol como fonte de carbono.

## 3.6 Métodos Analíticos

### 3.6.1 Determinação de biomassa

Para a determinação da biomassa foram coletados 10 mL do meio fermentado. O caldo coletado foi centrifugado (centrífuga modelo *Biofuge Stratus* com rotor 15000) a 5000 rpm (equivalentes a aproximadamente 7300 g) por 10 minutos, reservando o sobrenadante para posteriores análises. O precipitado foi lavado duas vezes com água destilada e centrifugado novamente. A biomassa foi quantificada espectrofotometricamente, a 600 nm, com o auxílio de curva-padrão de peso seco, previamente estabelecida. A concentração de biomassa produzida nos meios fermentados foi estimada pela Equação 1.

$$CONC = f.Abs.Dil \quad (\text{Eq. 1})$$

onde:

*CONC* - é a concentração de biomassa da amostra, expressa em g.L<sup>-1</sup>;

*f* - é o fator de concentração, expressa em g.L<sup>-1</sup>;

*Abs* - é a absorvância lida a 600 nm em espectrofotômetro e

*Dil* - a diluição estabelecida para a leitura espectrofotométrica.

### 3.6.2 Determinação da concentração de glicerol

As amostras foram filtradas, a vácuo, em cartucho C18 (BOND-ELUT VARIAN) e depois filtradas em filtro de nylon de 13 mm de diâmetro com porosidade de 0,45 µm (MILLIPORE). A concentração de glicerol foi medida através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando um sistema de HPLC VARIAN 210 equipado com um detector de índice de refração (modelo PROSTAR 355) e uma coluna MetaCarb 67H (6,5 x 300 mm) e pré-coluna (25 x 3 mm). A solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0,01N preparada com Água MiliQ (Simplicity 185, Millipore, Billerica, MA) foi utilizada como fase móvel com fluxo de 0,8 mL.min<sup>-1</sup> a 60 °C. O volume de injeção das amostras foi padronizado em 20 µL. As concentrações foram calculadas através de curva de calibração previamente definida dos constituintes de interesse identificados.

### 3.6.3 Determinação de cor instrumental – forma indireta de análise dos pigmentos dos meios fermentados

Segundo Meléndez-Martínez; Vicario; Heredia (2003), o teor de carotenoides de uma amostra líquida pode ser correlacionado com a sua pigmentação. Esta, por sua vez relaciona-se aos parâmetros  $a^*$  e  $b^*$ . A cor instrumental dos meios fermentados foi determinada através de análise colorimétrica empregando colorímetro Konica Minolta da marca CHROMA METER modelo CR 400. Durante a determinação da cor instrumental um feixe de luz é emitido sobre o material e, em seguida, a luz refletida é capturada fornecendo três variáveis:  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ . Os pigmentos carotenoides foram avaliados pelo sistema CIELab onde  $L^*$  indica (luminosidade/brilho) e parâmetros de cromaticidade  $a^*$  e  $b^*$  representam as coordenadas cromáticas, indicando as direções das cores. O  $L^*$  varia do preto (0) ao branco (100), o  $+a^*$  em direção do vermelho, o  $-a^*$  em direção do verde, o  $+b^*$  em direção do amarelo e o  $-b^*$  em direção do azul, na escala padrão de cromaticidade na faixa de - 60 até + 60, os quais foram medidos, utilizando iluminante D 65/10°. Desta forma, no presente trabalho o principal parâmetro estudado durante os processos fermentativos foi a cromaticidade  $+a^*$  que está associado aos principais pigmentos rosados formados pelas leveduras do gênero *Rhodotorula*.

### 3.6.4 Determinação da produtividade em biomassa ( $P_x$ )

$$P_x = \frac{X_f - X_0}{t_f} \quad (\text{Eq. 2})$$

onde:

$P_x$  - produtividade em biomassa ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ );

$\Delta X = X_f - X_0$  - variação da concentração de células em  $\text{g.L}^{-1}$ ;

$t_f$  - tempo final de fermentação em horas (h).

### 3.6.5 Determinação da produtividade do produto ( $P_p$ )

$$P_p = \frac{P_f - P_0}{t_f} \quad (\text{Eq. 3})$$

onde:

$P_p$  - produtividade do produto ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ );

$\Delta P = P_f - P_0$  - variação da concentração do produto em  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ;

$t_f$  - tempo final de fermentação em horas (h).

### 3.6.6 Determinação dos parâmetros cinéticos

As velocidades específicas de crescimento da levedura ( $\mu_x$ ), de consumo de substrato ( $\mu_s$ ) e de formação do produto ( $\mu_p$ ) foram calculadas, respectivamente, através das seguintes equações:

$$\mu_x = \frac{1}{X} \times \frac{dX}{dt} \quad (\text{Eq. 4})$$

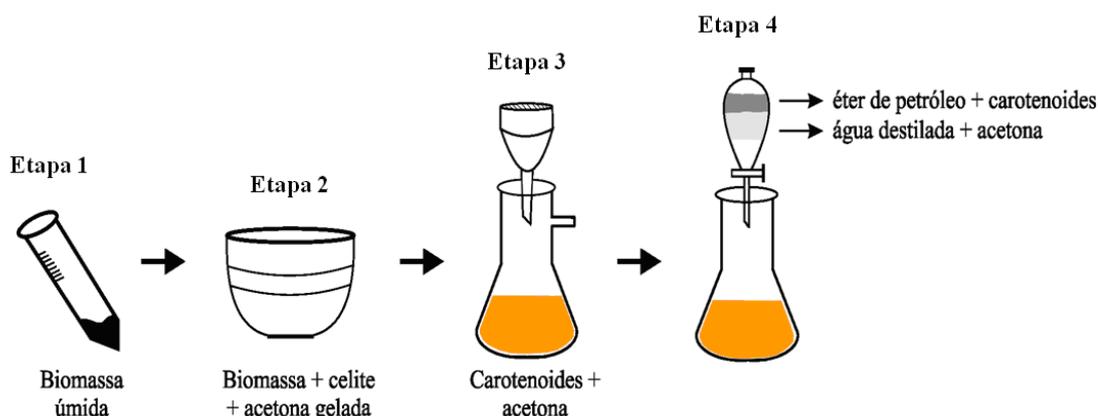
$$\mu_s = \frac{1}{X} \left( -\frac{dS}{dt} \right) \quad (\text{Eq. 5})$$

$$\mu_p = \frac{1}{X} \times \frac{dP}{dt} \quad (\text{Eq. 6})$$

### 3.6.7 Determinação do teor de carotenoides

Nos ensaios realizados em biorreatores, além da avaliação da cor instrumental, optou-se em determinar o teor de carotenoides em pontos experimentais previamente selecionados. As amostras desses pontos foram recolhidas e centrifugadas (5000 rpm, equivalentes a aproximadamente 7300 g) em tubo Falcon (Etapa 1). Após o descarte do sobrenadante, a biomassa foi empregada para extração e quantificação dos carotenoides. A biomassa foi colocada em almofariz de porcelana e macerada juntamente com celite 545 sigma Aldrich (hyflosupercel) e acetona resfriada (Etapa 2). A extração ocorreu sucessivas vezes até que a biomassa não apresentasse mais nenhuma pigmentação. A finalidade dessa etapa foi romper a parede celular das leveduras e extrair os pigmentos carotenoides intracelulares. A etapa seguinte consistiu na filtração dos carotenoides para a separação de resíduos, utilizando um funil de Buchner e filtro de papel (Etapa 3). Em seguida, a amostra foi colocada em funil de

separação, onde foram adicionados 20 mL de éter de petróleo. Os carotenoides foram então transferidos para o éter de petróleo, após sucessivas lavagens com água destilada (Etapa 4). A solução aquosa foi descartada e os carotenoides em éter de petróleo foram concentrados em rotaevaporador a  $35 \pm 1$  °C (MALDONADE; RODRIGUEZ-AMAYA; SCAMPARINI, 2012). A Figura 9 ilustra o processo de extração dos carotenoides para quantificação.



**Figura 9** – Desenho esquemático do método de extração de carotenoides

Os carotenoides foram quantificados espectrofotometricamente utilizando o comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 450 nm. A concentração de carotenoides foi estimada de acordo com fórmula estabelecida por Rodriguez-Amaya (2010), empregando o coeficiente de absorção do  $\beta$ -caroteno ( $A^{1\%}_{1\text{cm}} = 2592$ ). Assim para calcular a concentração de carotenoides ( $\mu\text{g/g}$ ), aplicou-se a Equação 5:

$$\text{Concentração de carotenoides } \mu\text{g/g} = \frac{A \times V \times 1000}{A_{cm}^{1\%} \times M \times 100} \quad (\text{Eq. 7})$$

onde:

$A$  - representa a absorbância da amostra;

$M$  - volume do éter de petróleo em mililitros (mL)

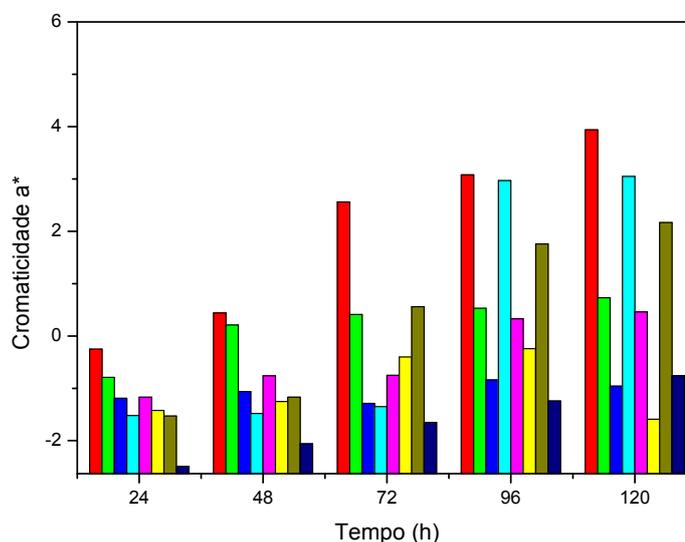
$V$  - tempo final de fermentação em horas (h);

$A_{cm}^{1\%}$  - coeficiente de absorção do carotenoide no solvente usado.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Teste de Seleção dos Micro-organismos em Meio EM Contendo Glicerol P.A

Os testes preliminares consistiram em avaliar o potencial de produção de carotenoides de oito leveduras do gênero *Rhodotorula* em meio Extrato de Malte (EM) modificado, no qual a glicose foi substituída pelo uso do glicerol P.A como fonte de carbono. Maldonade et al. (2007) caracterizou leveduras do gênero *Rhodotorula* que foram conduzidos a 30 °C por 120 h, utilizando caldo EM como principal meio de crescimento das leveduras. A seleção inicial das linhagens foi realizada através da avaliação da cor do meio fermentado, aplicado à cromaticidade  $a^*$ . A Figura 10 representa os resultados da cromaticidade  $a^*$  para os ensaios de seleção dos micro-organismos. Nesta etapa, selecionaram-se as leveduras que produziram maiores teores de pigmentos rosados, ou seja, maiores valores de  $a^*$ . Nesse contexto, foi possível observar o perfil de cromaticidade  $a^*$  em todas as linhagens em diferentes intervalos de tempo.



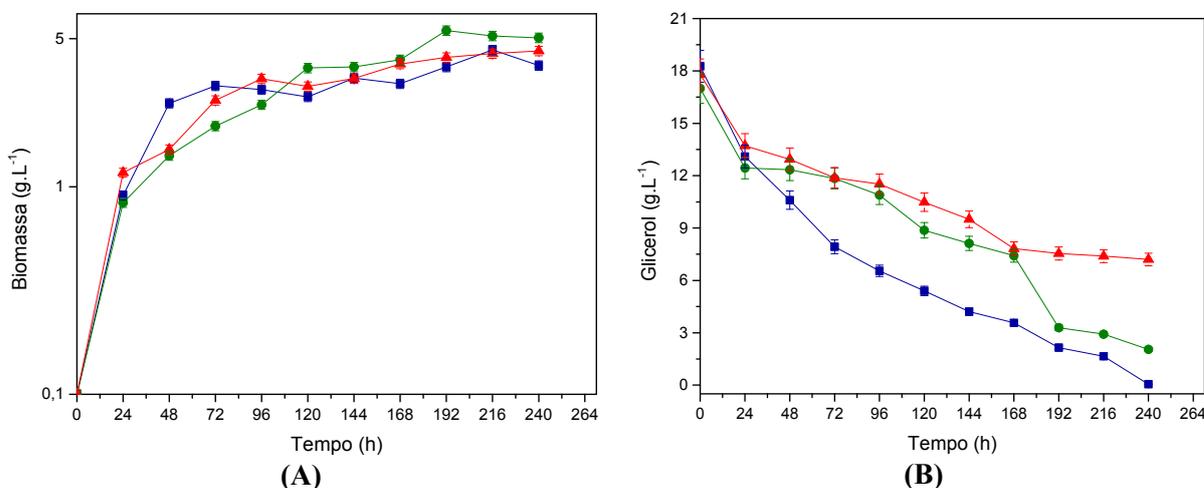
**Figura 10** – Perfil de cromaticidade  $a^*$  (+  $a^*$  em direção do vermelho e -  $a^*$  em direção do verde) *R. lactosa* CCT 2057 (■), *R. rubra* CCT 5470 (■), *R. glutinis* URM 3961 (■), *R. glutinis* URM 5724 (■), *R. glutinis* URM 1348 (■), *R. rubra* URM 5183 (■), *R. aurantiaca* URM 5726 (■), *R. minuta* URM 5185 (■) durante os testes de seleção conduzidos a 30 °C e 150 rpm durante 120 h

De acordo com Meléndez-Martínez; Vicario; Heredia (2003), o teor de carotenoides de uma amostra líquida pode ser correlacionado com a sua pigmentação. Assim sendo, observou-se ao longo do tempo que quanto maior o valor da cromaticidade  $a^*$ , maior poderia

ser a quantidade de pigmentos carotenoides rosados formados. Segundo Maldonado; Rodriguez-Amaya; Scamparini, (2012), a carotenogênese vai depender da capacidade da linhagem produzir diferentes quantidades de carotenoides e das condições de cultivo a que foi submetida. Desta forma, foram selecionadas para a etapa seguinte as linhagens, *R. glutinis* URM 5724, *R. lactosa* CCT 2057 e a *R. aurantiaca* URM 5726 que obtiveram o melhor desempenho nestes testes preliminares. Essas leveduras apresentaram produção de cor considerável em EM modificado, demonstrando a viabilidade econômica do emprego do glicerol como fonte de carbono em processos fermentativos.

#### 4.2 Teste de Seleção em Meio Contendo Glicerol P.A.

Nesta etapa, além do perfil de cromaticidade  $a^*$ , foram avaliados o consumo de glicerol, biomassa produzida e perfil do pH. A Figura 11 mostra os resultados da concentração de biomassa e consumo de glicerol para as linhagens *R. glutinis* URM 5724, *R. lactosa* CCT 2057 e a *R. aurantiaca* URM 5726.



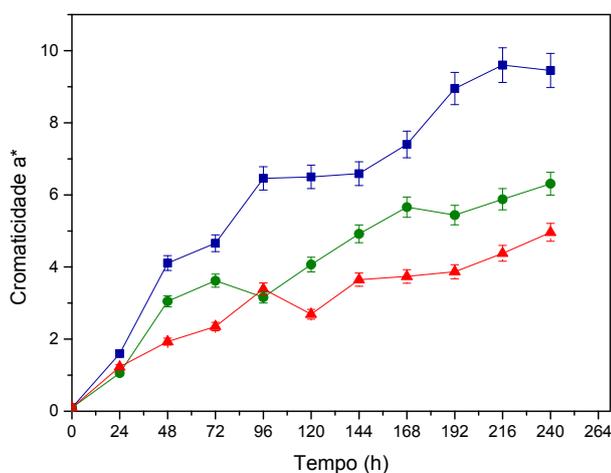
**Figura 11** – Produção de biomassa (A) e consumo de glicerol (B) por *R. lactosa* CCT 2057 (▲), *R. glutinis* URM 5724 (●) e *R. aurantiaca* URM 5726 (■) a 30 °C e 150 rpm em meio contendo glicerol

Observando os valores obtidos para biomassa (Figura 11A), percebeu-se que, a maior quantidade de biomassa formada ( $5,45 \pm 0,02 \text{ g.L}^{-1}$ ) ocorreu a partir de 192 h de processo em cultivos com *R. glutinis* URM 5724. Ao final de 240 h de fermentação, a quantidade máxima de biomassa obtida pelas leveduras *R. aurantiaca* URM 5726, *R. glutinis* URM 5724 e *R. lactosa* CCT 2057 foram respectivamente,  $3,80 \pm 0,1 \text{ g.L}^{-1}$ ;  $5,05 \pm 0,2 \text{ g.L}^{-1}$  e  $4,39 \pm 0,2 \text{ g.L}^{-1}$ . Em Maldonado; Rodriguez-Amaya; Scamparini (2012), *Rhodotorula mucilaginosa*-137

produziu  $5,3 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa utilizando uma combinação de  $5,0 \text{ g.L}^{-1}$  extrato de levedura e  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose. Contudo no experimento aqui demonstrado, a combinação de  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol e  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de extrato de levedura, desencadearam uma produção de  $5,45 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa de *Rhodotorula glutinis* URM 5724.

Em experimentos conduzidos por Petrik et al. (2013), o glicerol foi aplicado como única fonte de carbono e energia para o crescimento de *Rhodotorula lactosa*, onde o rendimento máximo de biomassa foi obtido após 20 h de fermentação utilizando  $21,5 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol. Os autores ainda reportaram que o crescimento da levedura passou a ser inibido na presença de  $28,0 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol e, que concentrações inibitórias modificaram a morfologia das células.

O glicerol foi consumido por todas as linhagens (Figura 11B), porém *R. aurantiaca* URM 5726 e *R. glutinis* URM 5724 consumiram quase a totalidade do glicerol adicionado ao meio. No entanto, observando o consumo de glicerol por *R. lactosa* CCT 2057 percebeu-se acúmulo dessa fonte de carbono, resultando numa concentração de  $7,2 \pm 0,3 \text{ g.L}^{-1}$  ao final do processo.

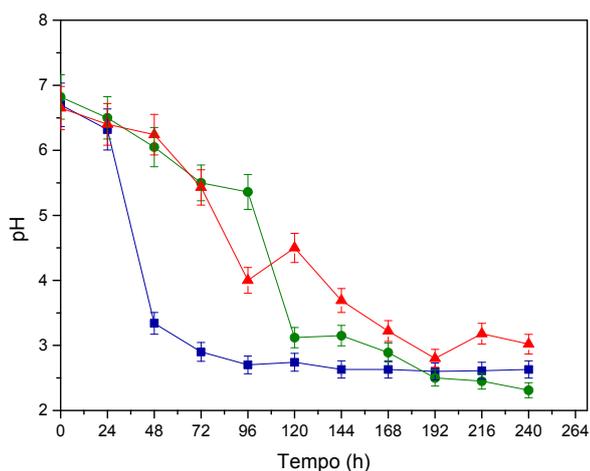


**Figura 12** – Perfil da cromaticidade  $a^*$  por *R. lactosa* CCT 2057 (▲), *R. glutinis* URM 5724 (●), *R. aurantiaca* URM 5726 (■) a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  e 150 rpm em meio contendo glicerol

Verificou-se que cinética de produção de cor por *R. aurantica* URM 5726 apresentou valores mais elevados para cromaticidade  $a^*$  durante todo o processo fermentativo (Figura 12). Contudo, os valores correspondentes a cromaticidade  $a^*$  observados ao final do processo fermentativo para *R. aurantiaca* URM 5726, *R. glutinis* URM 5724 e *R. lactosa* CCT 2057 foram de  $+9,45 \pm 0,4$ ,  $+6,31 \pm 0,3$  e  $+4,96 \pm 0,2$ , respectivamente.

Nesta etapa também houve o acompanhamento do pH ao longo do processo fermentativo (Figura 13). Percebeu-se variação expressiva do pH, em relação ao valor inicial,

ao longo das fermentações. Inicialmente o pH manteve-se constante, em torno de 6,5, no entanto, após 24 h de fermentação houve uma queda brusca dos valores. Todas as leveduras apresentaram o mesmo perfil de decréscimo do pH. Os cultivos com *R. aurantiaca* URM 5726 apresentaram queda mais acentuada do pH em 48 h e, que após esse período praticamente mantiveram-se constantes (em torno de 3,0) até o final do processo fermentativo (240 h).



**Figura 13** – Comportamento do pH das leveduras de *R. lactosa* CCT 2057 (▲), *R. glutinis* URM 5724 (●), *R. aurantiaca* URM 5726 (■) a 30 °C e 150 rpm em meio contendo glicerol

Valduga et al. (2009) em um “review” e, citando as investigações de Frengova et al. (1994), descrevem que a biossíntese de carotenoides naturalmente ocasiona mudanças do pH do meio de cultivo, como consequência do crescimento da levedura. O decréscimo do pH ocorre nas primeiras 72 h de fermentação e a partir desse período permanece constante. Voaides e Dima (2012) investigando três linhagens do gênero *Rhodotorula*, em cultivos empregando glicose e diferentes fontes de nitrogênio, constataram decréscimo nos valores de pH a partir de 24 h de processo. Os autores apontaram que nas distintas condições experimentais, a curva de decréscimo de pH dos cultivos foi bastante similar para as diferentes espécies de *Rhodotorula*, atingindo, ao final da fermentação, valores entre 2,0 - 2,5.

Desta forma, os testes em meio contendo glicerol P.A como fonte carbono, demonstraram que o melhor desempenho foi alcançado pela *R. aurantiaca* URM 5726, que apresentou os melhores perfis de cromaticidade  $a^*$ , apesar da levedura ter demonstrado menores valores de biomassa.

### **4.3 Testes em Erlenmeyers de 2 L: comparação entre o desempenho do glicerol P.A e glicerol bruto**

De acordo com os resultados obtidos nos experimentos anteriores, selecionou-se para esta etapa *R. aurantiaca* URM 5726, que demonstrou o melhor desempenho no consumo de glicerol e cromaticidade  $a^*$ .

Nos experimentos conduzidos em Erlenmeyers de 2 L foi incorporada também a linhagem *R. mucilaginosa* CMIAT 164, anteriormente investigada por Almeida (2010) e Branco (2010). Os autores avaliaram os parâmetros de crescimento da levedura na produção de biomassa rica em carotenoides em Erlenmeyers de 250 mL utilizando glicerol P.A como fonte de carbono (ALMEIDA, 2010) e em biorreator de 14 L empregando glicose como fonte de carbono (BRANCO, 2010). Nas duas investigações, *R. mucilaginosa* CMIAT 164 apresentou melhor desempenho no que concerne o consumo das fontes carbono e nitrogênio e produção de pigmentos carotenoides e biomassa.

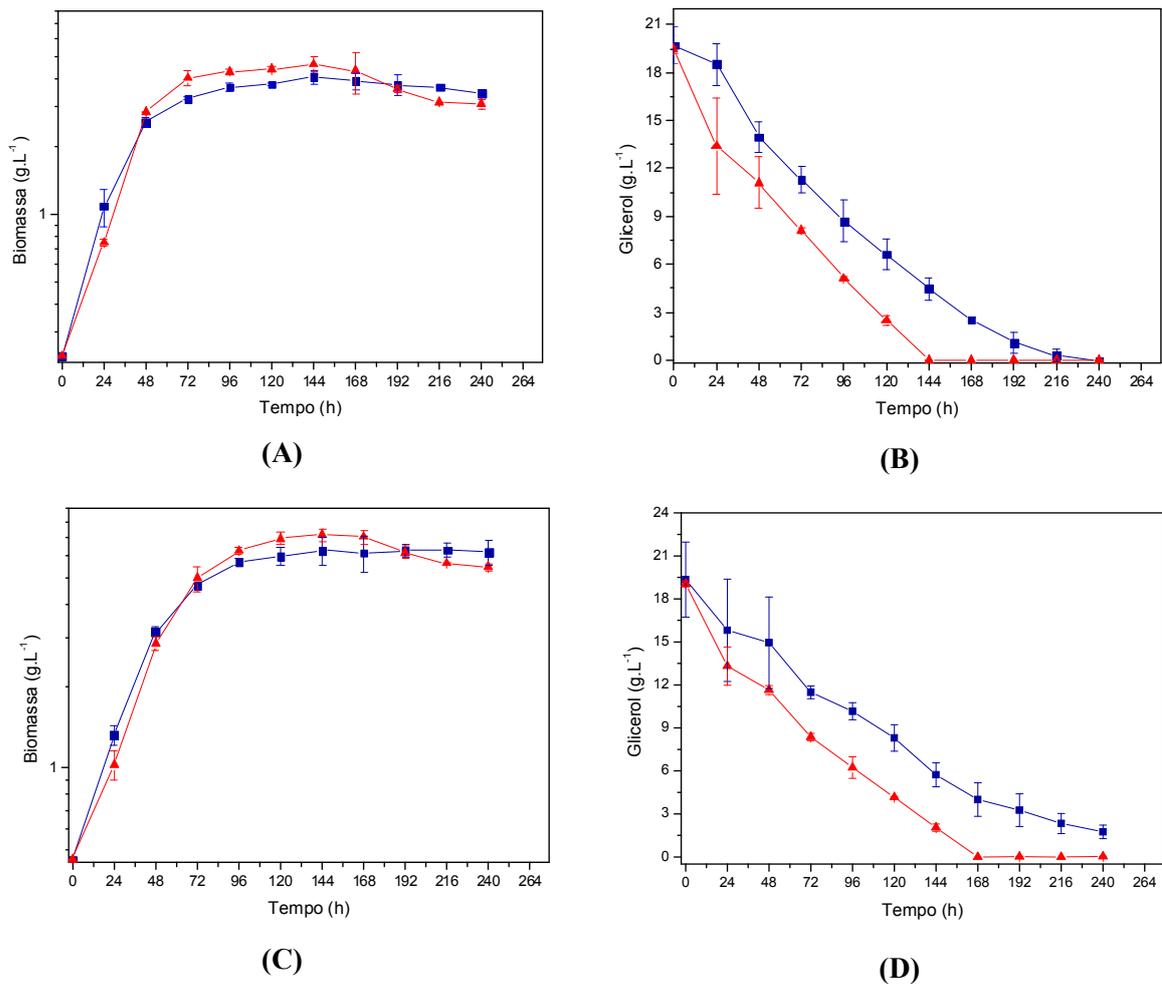
Os ensaios em Erlenmeyers de 2 L foram realizados com o intuito de comparar o comportamento das linhagens em relação à produção de biomassa, consumo de glicerol e cromaticidade  $a^*$ , em meio contendo glicerol P.A e glicerol bruto como fontes de carbono, mediante ampliação volumétrica do meio de fermentação para 500 mL

A Figura 14 apresenta o perfil da produção de biomassa e consumo de glicerol pelas leveduras *R. aurantiaca* URM 5726 e *R. mucilaginosa* CMIAT 164 em Erlenmeyers de 2 L, contendo 500 mL de meio reacional.

Nos cultivos com *R. aurantiaca* URM 5726 observou-se que a maior quantidade de biomassa produzida ( $4,64 \pm 0,3 \text{ g.L}^{-1}$ ) ocorreu com 144 h de fermentação no meio contendo glicerol bruto (Figura 14A). Constatou-se também que, no mesmo período de fermentação, nos cultivos contendo glicerol P.A, a produção de biomassa alcançada foi de  $4,06 \pm 0,3 \text{ g.L}^{-1}$ . No entanto, é importante salientar que a partir de 72 h de fermentação, praticamente não houve acréscimo na produção de biomassa, mantendo-se constante até o final do processo fermentativo (meio com glicerol P.A) ou ainda, apresentou pequena queda de produção (meio com glicerol bruto) a partir de 168 h. De acordo com resultados obtidos por Saenge et al. (2011), valores similares de biomassa de *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159 ( $4,53 \pm 0,31 \text{ g.L}^{-1}$ ) foram obtidos com 72 h de fermentação utilizando glicerol bruto como fonte de carbono e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.

Avaliando o consumo de glicerol (Figura 14B), observou-se que a *R. aurantiaca* URM 5724 consumiu quase a totalidade do glicerol disponível no meio de fermentação,

independentemente do tipo de glicerol utilizado. Entretanto, a assimilação desses substratos mostrou-se gradativa. Vale salientar que o consumo de glicerol bruto pela *Rhodotorula aurantiaca* URM 5724 foi mais rápido, esgotando-se em 144 h de fermentação. Nesse mesmo tempo, em que não apresentava glicerol bruto, ainda restavam  $4,48 \pm 0,70 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol P.A no meio. Desta forma, o consumo de glicerol P.A pela levedura mostrou-se mais lento, esgotando-se apenas no final do processo fermentativo.



**Figura 14** – Produção de biomassa em glicerol P.A (■) e glicerol bruto (▲) por *R. aurantiaca* UMR 5726 (A) e *R. mucilaginosa* CMIAT 164 (C) e Consumo de glicerol P.A (■) e glicerol bruto (▲) por *R. aurantiaca* UMR 5726 (B) e *R. mucilaginosa* CMIAT 164 (D) na ampliação volumétrica de 500 mL a 30 °C e 150 rpm

Considerando o perfil de biomassa da Figura 14C, em diferentes composições de glicerol, observou-se que a maior produção de biomassa por *R. mucilaginosa* CMIAT 164, independente da fonte de carbono utilizada, ocorreu em 144 h de fermentação, a partir desse ponto houve pouca alteração no perfil de biomassa. Portanto, a quantidade de biomassa produzida com 144 h de fermentação, utilizando glicerol bruto e glicerol P.A como fonte de

carbono, foram de  $7,1 \pm 0,3 \text{ g.L}^{-1}$  e  $6,3 \pm 0,7 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente. Marova et al. (2012), avaliando diferentes substratos para a produção de carotenoides por espécies *Rhodotorula*, demonstrou que a *Rhodotorula glutinis* quando cultivada em frasco Erlenmeyer utilizando glicose como fonte de carbono após 80 h de fermentação, produziu  $5,91 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa. No presente trabalho, utilizando glicerol bruto como fonte de carbono, foi possível produzir  $6,2 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa no mesmo intervalo de tempo. Pesquisas vêm sendo realizadas para a otimização das condições de cultivo e fatores de crescimento que influenciam diretamente no crescimento celular, a fim de melhorar a eficiência na produção de carotenoides e consequentemente diminuir o custo do processo biotecnológico.

Nos cultivos com *R. mucilaginosa* CMIAT 164 (Figura 14D) observou-se que o glicerol bruto foi gradativamente consumido, esgotando-se em 168 horas de fermentação. Já o consumo de glicerol P.A pela levedura foi mais lento, demonstrando acúmulo desse substrato, no mesmo tempo em que o glicerol bruto havia sido esgotado. Assim sendo, no intervalo de 168 h de fermentação, a quantidade de glicerol P.A ainda presente no meio de cultivo era de  $4,0 \pm 1,17 \text{ g.L}^{-1}$ .

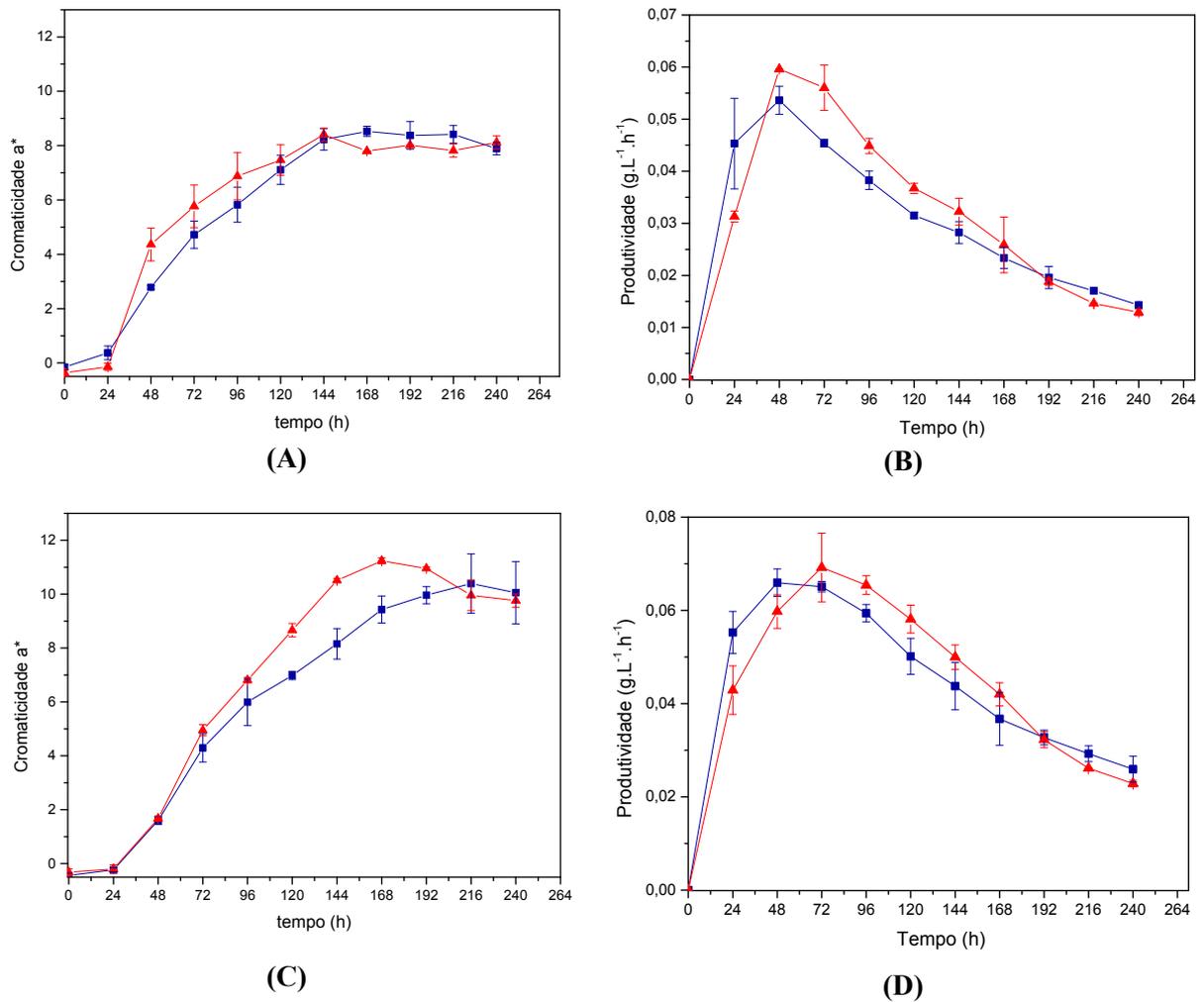
Nitayavardhana e Khanal (2011) avaliaram a possibilidade de cultivar fungos em glicerol bruto como única fonte de carbono. Foram testadas diferentes fontes de carbono, incluindo extrato de levedura, glicerol P.A e glicerol bruto. A análise estatística dos dados mostrou diferença significativa entre os rendimentos de biomassa de fungos. A maior produção de biomassa foi obtida em amostras que continham glicerol bruto. Entretanto, o crescimento do fungo em glicerol bruto não foi consideravelmente diferente do seu crescimento em extrato de levedura, uma vez que esse último é tipicamente empregado em cultivos de micro-organismos.

Avaliando os perfis de consumo de glicerol P.A e bruto por *R. mucilaginosa* CMIAT 164 e *R. aurantiaca* URM 5726, observou-se que o glicerol bruto foi totalmente consumido antes do término do processo fermentativo e que ao final desse processo ainda restavam no meio em torno de  $4,0 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol P.A.

Petrik et al. (2013) realizaram estudos com as leveduras *Rhodotorula glutinis* – CCY 20-2-26, *Rhodotorula rubra* – CCY 20-7-28 e *Rhodotorula aurantiaca* – CCY 20-9-7, utilizando diferentes combinações de fontes de carbono (glicerol P.A, glicerol bruto e glicose) nos processos fermentativos. Os autores demonstraram que a síntese de carotenoides e a produção biomassa foram satisfatórias quando empregou-se glicerol bruto como fonte carbono.

Foi avaliada também nesta etapa experimental a cor instrumental dos cultivos (Figura 15). Em relação à cromaticidade  $a^*$ , nos meios fermentados com *R. aurantiaca* URM 5726 (Figura 15A), observou-se que a cromaticidade  $a^*$  atingiu produção máxima em 168 h de fermentação, alcançando teor máximo de  $+ 8,52 \pm 0,2$  em glicerol P.A e  $+ 8,40 \pm 0,2$  em glicerol bruto. A partir desse intervalo de tempo a síntese de pigmentos manteve-se constante até o final da fermentação. Para ambos experimentos, a síntese de carotenoides apresentou comportamento similar.

A maior produtividade em biomassa em ambos os meios ocorreu em 48 h de fermentação. Nos experimentos empregando glicerol bruto o valor máximo alcançado foi de  $0,059 \pm 0,001 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e em meios utilizando glicerol P.A o valor alcançado foi de  $0,053 \pm 0,002 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Desta forma, o maior valor de produtividade em biomassa de *R. aurantiaca* URM 5726 foi alcançado no processo fermentativo que apresentava em sua composição glicerol bruto como fonte carbono (Figura 15B).



**Figura 15** – Cromaticidade  $a^*$  em glicerol P.A (■) e glicerol bruto (▲) por *R. aurantiaca* UMR 5726 (A) e *R. mucilaginosa* CMIAT 164 (C) e Produtividade em biomassa em glicerol P.A (■) e glicerol bruto (▲) por *R. aurantiaca* UMR 5726 (B) e *R. mucilaginosa* CMIAT 164 (D) na ampliação volumétrica de 500 mL a 30 °C e 150 rpm

Avaliando a curva de cromaticidade  $a^*$  da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164, o maior valor observado foi de  $+ 11,23 \pm 0,1$  em 168 h de fermentação empregando-se glicerol bruto como fonte de carbono (Figura 15C). No entanto, no mesmo intervalo tempo, a *R. mucilaginosa* CMIAT 164 alcançou um valor de  $+ 9,43 \pm 0,5$  utilizando glicerol P.A como fonte de carbono. Nos meios de cultivo com o glicerol P.A, o valor máximo de cromaticidade  $a^*$  observada foi com 216 h apresentando um valor de  $+ 10,39 \pm 1,0$ .

Foi possível verificar que a substituição do glicerol P.A por glicerol bruto nos meios fermentativos, proporcionou um aumento em torno de 8,0 % nas determinações de cromaticidade  $a^*$  nos testes realizados com *R. mucilaginosa* CMIAT 164. Os valores de cromaticidade  $a^*$  foram maiores em 168 h, sugerindo que a produção de carotenoides

possivelmente vinculou-se ao metabolismo secundário, já que a fonte de carbono havia esgotado nesse intervalo de tempo.

A maior produtividade em biomassa de *R. mucilaginosa* CMIAT 164 (Figura 15D) ocorreu em 72 h de fermentação utilizando glicerol bruto como fonte de carbono. Nesse intervalo de tempo a produtividade alcançou valor máximo de  $0,069 \pm 0,007 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Empregando-se glicerol P.A como fonte de carbono a maior produtividade alcançada ( $0,065 \pm 0,001 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) ocorreu em 48 h de fermentação.

De acordo com os resultados apresentados, foi possível observar que os maiores valores alcançados de cromaticidade  $a^*$  e produtividade em biomassa por *R. mucilaginosa* CMIAT 164 e *R. aurantiaca* URM 5726 foram nos ensaios conduzidos com glicerol bruto como fonte carbono. Dentre as linhagens testadas a levedura que obteve maior destaque nos processos fermentativos conduzidos com glicerol bruto foi a *R. mucilaginosa* CMIAT 164 que apresentou maiores valores de cromaticidade  $a^*$  ( $+ 11,23 \pm 0,1$ ) e produtividade em biomassa ( $0,069 \pm 0,007 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ).

Os resultados obtidos com a ampliação volumétrica de 500 mL demonstraram que as linhagens do gênero *Rhodotorula* apresentaram crescimento expressivo nos meios de fermentação contendo glicerol P.A e glicerol bruto como fontes de carbono. Contudo, maiores valores foram obtidos nas fermentações conduzidas com glicerol bruto. Segundo Cüelik et al. (2008) e Nitayavardhana e Khanal (2011), o glicerol bruto, proveniente do biodiesel, contém macroatmentos importantes para o metabolismo da levedura, tais como cálcio, potássio, magnésio, sódio, enxofre e um teor orgânico extremamente elevado ( $540 \text{ g.L}^{-1}$  de carbono orgânico total (COT)), sinalizando uma preferência das leveduras *R. aurantiaca* URM 5726 e *R. mucilaginosa* CMIAT 164, por essa fonte de carbono mais complexa.

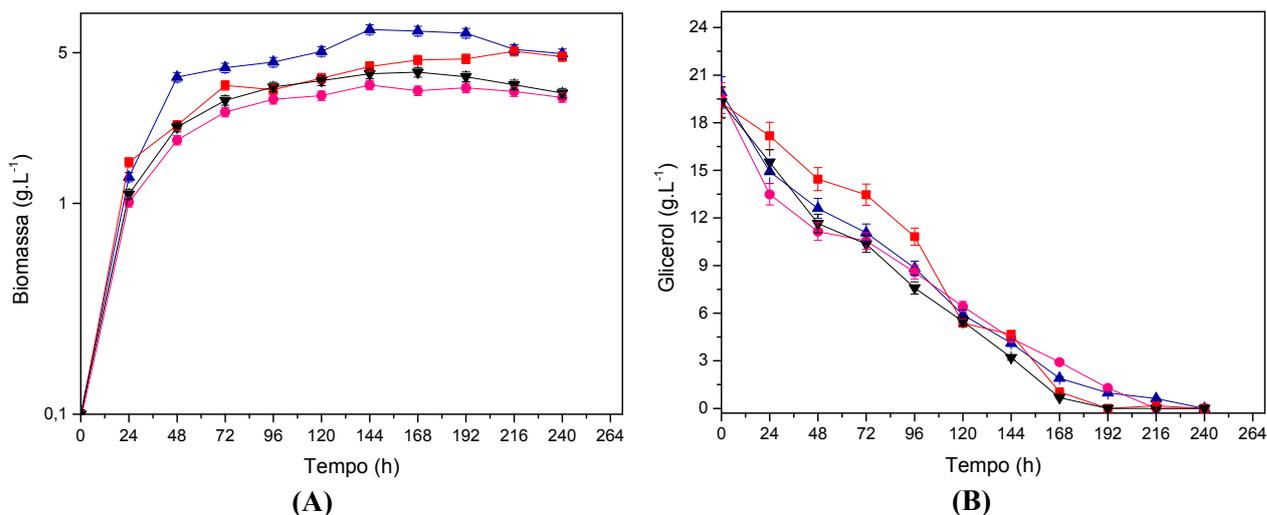
Os resultados ainda sugerem que o acúmulo do metabólito no meio, relacionou-se à fase estacionária de crescimento das linhagens, independentemente da fonte de carbono avaliada (glicerol P.A ou bruto).

#### **4.4 Fermentação em Biorreator de Bancada: Influência do tempo de propagação do inóculo**

Os testes iniciais em biorreator consistiram em avaliar a influência da idade do inóculo no crescimento e produção de pigmentos. Autores como Aksu e Eren (2005) utilizaram inóculo de *Rhodotorula mucilaginosa* NRRL-2502, previamente adaptado em meio de

crescimento, onde as células na fase log foram transferidas para um mesmo meio de cultivo. Neste sentido, o intuito desta etapa do trabalho foi avaliar inóculo de *R. mucilaginosa* CMIAT 164 e *R. aurantiaca* URM 5726 em diferentes períodos de cultivo, visando uma maior produção de biomassa, consumo de glicerol e cromaticidade  $a^*$ , em um menor intervalo de tempo. Os biorreatores foram inoculados com leveduras em fase exponencial de crescimento (inóculo proveniente de cultivo de 48 h de propagação) e com leveduras em fase estacionária (inóculo proveniente de cultivo de 120 h de propagação) a partir do cultivo em Erlenmeyers de 2 L. A Figura 16 representa o perfil da produção de biomassa e o consumo de glicerol bruto por *R. aurantiaca* URM 5726 e *R. mucilaginosa* CMIAT 164 durante todo processo fermentativo.

Os experimentos realizados com *R. mucilaginosa* CMIAT 164, com inóculo proveniente de 48 h de propagação, apresentaram maior produção de biomassa ( $6,35 \pm 0,3 \text{ g.L}^{-1}$ ) em 144 h de fermentação (Figura 16A). Esse valor é semelhante ao registrado nos experimentos anteriormente realizados com Erlenmeyers de 2 L utilizando glicerol bruto como fonte de carbono. A partir de 144 h de fermentação, a produção de biomassa permaneceu constante e, ao final do processo fermentativo apresentou uma pequena queda nos valores finais de biomassa de  $4,95 \pm 0,2 \text{ g.L}^{-1}$ . Nos ensaios conduzidos com inóculo produzido em 120 h, a maior produção de biomassa de *R. mucilaginosa* CMIAT 164 foi de  $5,08 \pm 0,2 \text{ g.L}^{-1}$  em 216 h do processo fermentativo. Porém, a maior concentração de biomassa de *R. aurantiaca* URM 5726 observada com 120 h de propagação não ultrapassou de  $4,01 \pm 0,2 \text{ g.L}^{-1}$  e, foi obtida em 144 h de fermentação.

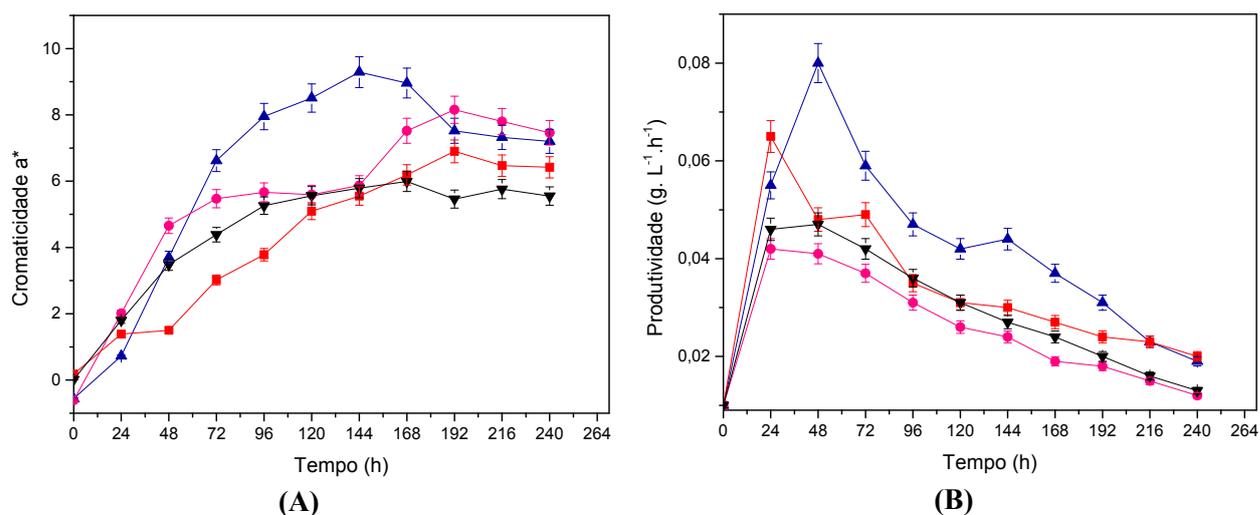


**Figura 16** – Produção de biomassa (A) e Consumo de glicerol bruto (B) por *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT164 Inóculo de 48h (▲) e Inóculo de 120h (■) e *R. aurantiaca* URM 5726 Inóculo de 48h (●) e Inóculo de 120h (▼) em biorreator de bancada de 3 L a 30 °C e 150 rpm

Contudo, verificou-se que as curvas de crescimento, independentemente do tempo de propagação dos inóculos (48 ou 120 h), apresentaram perfis semelhantes, sinalizando que a fase estacionária inicia-se a partir de 72 h.

A Figura 16B mostra o consumo do glicerol bruto pelas linhagens em função das diferentes condições experimentais. Evidente similaridade no glicerol residual é notada nas diferentes condições experimentais. A particularidade é apenas percebida nas fermentações com *R. mucilaginosa* CMIAT 164 e inóculo com 120 h de propagação, onde o consumo de glicerol foi mais lento. De qualquer modo as curvas de consumo de glicerol indicam que ao final de 240 h de fermentação todo o glicerol havia sido consumido, independente do tempo cultivo dos inóculos.

A Figura 17A apresenta os perfis de cromaticidade  $a^*$  das leveduras. Nos experimentos realizados com *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164, o maior valor de cromaticidade  $a^*$ , empregando inóculo de 48 h, foi em 144 h de fermentação, alcançando um valor máximo de  $+9,29 \pm 0,5$ . Porém, em cultivos realizados com *R. aurantiaca* URM 5726, o máximo valor de cromaticidade  $a^*$  ( $+8,15 \pm 0,4$ ) foi alcançado em 192 h de fermentação, no mesmo tempo de propagação do inóculo. Contudo, nos experimentos realizados com inóculo de 120 h, independente da levedura, os valores de cromaticidade  $a^*$  foram inferiores aos valores encontrados com inóculo de 48h.

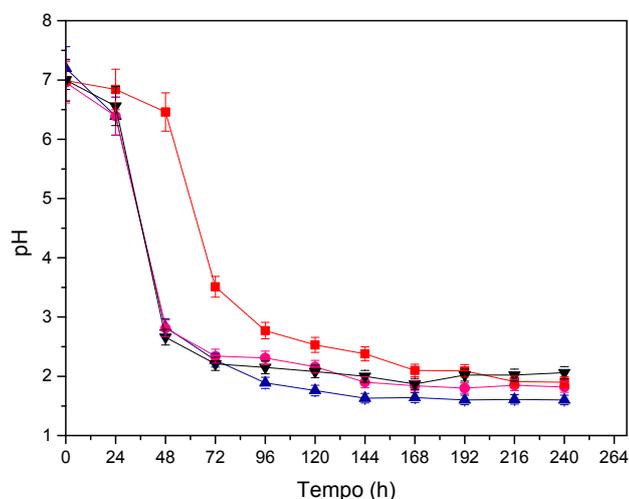


**Figura 17** – Cromaticidade  $a^*$  (A) e Produtividade em biomassa (B) por *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 Inóculo de 48h (▲) e Inóculo de 120h (■) e *R. aurantiaca* URM 5726 Inóculo de 48h (●) e Inóculo de 120h (▼) em biorreator de bancada de 3 L a 30 °C e 150 rpm

A produtividade em biomassa (Figura 17B) foi calculada para todos os cultivos com *R. mucilaginosa* CMIAT 164 e *R. aurantiaca* URM 5726. De acordo com o perfil gráfico dos processos fermentativos foi possível observar que os experimentos realizados com *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164, que empregaram inóculo de 48 h de propagação, obtiveram os melhores resultados de produtividade ( $0,08 \pm 0,004 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ). Tais constatações confirmaram que a inoculação de uma suspensão de 48 h de propagação tem impacto mais considerável na produtividade do processo.

Em geral, a biossíntese de metabólitos é regulada pelos níveis e atividades de enzimas empregadas no fluxo total de carbono através do sistema metabólico. A eficiência do fluxo depende da cooperação das variáveis individuais envolvidas neste processo e qual caminho é suprimido ou ativado e depende da composição do meio, do crescimento, das condições de cultivo, das espécies microbianas e seu estágio de desenvolvimento. O rendimento global de metabólitos formado está diretamente relacionado com o rendimento total da biomassa. Assim, é necessário manter elevadas as taxas de crescimento e a eficiência do fluxo de carbono para a produção de carotenoides, a fim de atingir a produtividade máxima desse metabólito (MAROVA; CERTIK; BREIEROVA, 2011). O emprego de micro-organismos, em plena atividade metabólica, foi a estratégia adotada na investigação conduzida por Chatzifragou et al. (2011). Os autores avaliaram a conversão biotecnológica do glicerol, derivado do biodiesel, por leveduras do gênero *Rhodotorula* sp., empregando uma suspensão de leveduras na fase exponencial de crescimento (24 h de propagação).

O pH foi monitorado diariamente durante o processo fermentativo, os resultados estão apresentados na Figura 18. O perfil de pH dos meios de fermentação apresentou uma tendência semelhante para todas as condições avaliadas. Houve variação do pH, em relação ao pH inicial, ao longo do processo. Inicialmente o pH manteve-se constante, em torno de  $6,6 \pm 0,4$ , no entanto, após 24 horas de fermentação, houve uma queda brusca dos valores. No período entre 24 e 48 horas de fermentação, o pH dos meios fermentativos caiu de 6,5 para cerca de 3,0 e, estabilizou-se em torno de 2,0 a partir de 72 h até o final do processo fermentativo.



**Figura 18** – Perfil de pH por *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164: Inóculo de 48h (▲) e Inóculo de 120h (■), e *R. aurantiaca* URM 5726: Inóculo de 48h (●) e Inóculo de 120h (▼) em biorreator de bancada de 3 L a 30 °C e 150 rpm

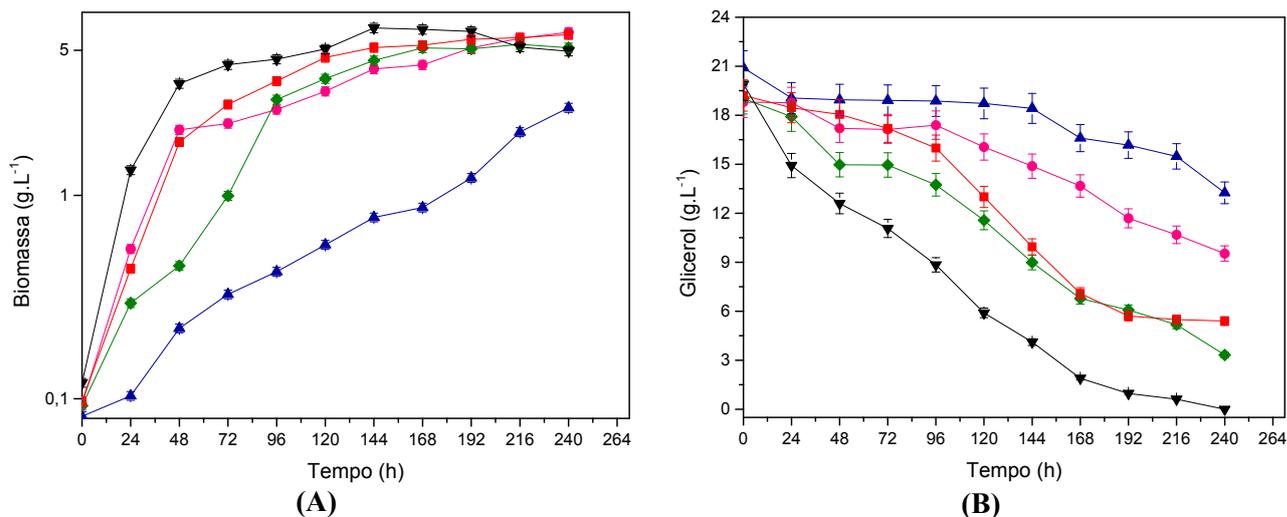
Os testes iniciais em biorreatores com as linhagens do gênero *Rhodotorula* mostraram-se bastante promissores, devido à facilidade de adaptação dos micro-organismos a fonte de carbono e a rápida assimilação do glicerol bruto. Desta forma, estabeleceu-se para as próximas etapas em biorreator o emprego da linhagem *R. mucilaginosa* CMIAT 164, propagada em 48 h, uma vez que a síntese de biomassa, pigmentos (cromaticidade  $a^*$ ) e produtividade em biomassa foram maiores empregando esse micro-organismo nas referidas condições.

#### **4.5 Influência da temperatura na produção de levedura carotenogênica**

Avaliou-se nesta etapa a influência de diferentes temperaturas de incubação no processo de produção de carotenoides por *R. mucilaginosa* CMIAT 164. As condições operacionais do biorreator, bem como, o tempo de propagação do inóculo foram estabelecidas em função dos resultados já expostos anteriormente. A faixa de temperatura avaliada foi de 10 a 30 °C, uma que a literatura ressalta que as melhores condições de cultivo de espécies *Rhodotorula* ocorrem entre 20 e 30 °C (YEN WEI et al., 2014; CUTZU et al., 2013; IRAZUSTA et al., 2013; PETRIK et al., 2013; SCHNEIDER et al., 2013; UNGUREANU et al., 2013; MAROVA et al., 2011; YEN WEI et al., 2011; BUZINNI et al., 1999).

A Figura 19A representa o perfil de produção da biomassa e consumo de glicerol por *R. mucilaginosa* CMIAT 164 durante o processo fermentativo. A maior produção de biomassa ( $6,35 \pm 0,3 \text{ g.L}^{-1}$ ) foi detectada nas fermentações conduzidas a 30 °C em 144 h de processo. A partir de 96 h, iniciou-se a fase estacionária de crescimento, mantendo-se constante até o final do processo fermentativo. A 25 °C, que foi a segunda melhor temperatura de crescimento, apresentou fase estacionária a partir de 120 h de fermentação. A curva de crescimento da fermentação conduzida a 10 °C não apresentou o mesmo perfil das demais temperaturas testadas. A levedura produziu gradativamente, até o final do processo fermentativo, uma menor quantidade de biomassa. Desta forma, ao final de 240 h de fermentação, o valor máximo alcançado pela levedura foi de  $2,66 \pm 0,1 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa.

Resultados semelhantes foram obtidos por Aksu e Eren (2005), os quais avaliaram o comportamento de *Rhodotorula mucilaginosa* sobre crescimento e a produção de carotenoides em diferentes fontes de carbono. De acordo com os resultados obtidos pelos autores, o crescimento do micro-organismo começou após a fase lag (9 -10 h). A concentração aumentou exponencialmente até 50 h e a partir de 120 h, a taxa de crescimento atingiu a fase estacionária.

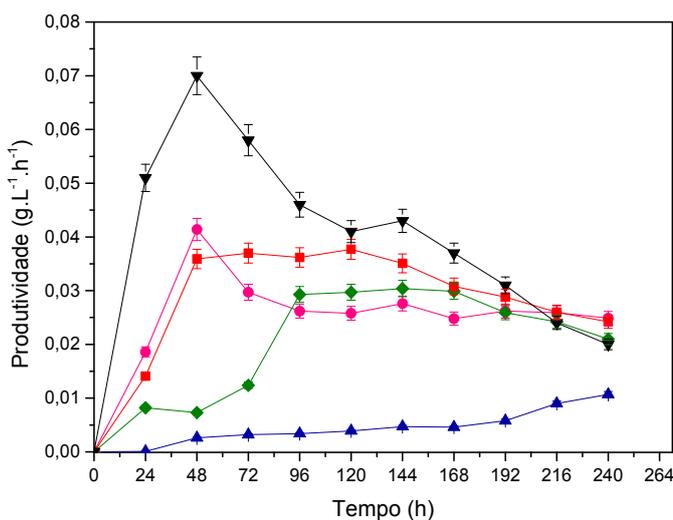


**Figura 19** – Produção de biomassa (A) e Consumo de glicerol (B) por *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 sob diferentes temperaturas de incubação 10 °C (▲), 15 °C (●), 20 °C (◆), 25 °C (■) e 30 °C (▼) em biorreator de bancada de 3 L a 150 rpm

Avaliando o perfil de consumo do glicerol (Figura 19B), sob diferentes temperaturas de incubação, pode-se observar que as curvas apresentaram perfis semelhantes, com exceção do experimento conduzido a 10 °C, que inicialmente não apresentou consumo do glicerol, mantendo-se constante até 144 h de fermentação. A 15 °C não houve consumo expressivo de glicerol entre 48 e 96 h de fermentação, havendo consumo gradativo somente após esse tempo. Nos dois processos fermentativos houve um acúmulo considerável de glicerol no meio de cultivo e os valores encontrados para 10 °C e 15 °C foram de  $13,25 \pm 0,7 \text{ g.L}^{-1}$  e  $9,53 \pm 0,5 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente. O melhor perfil de consumo de glicerol foi obtido através do experimento conduzido a 30 °C. A levedura consumiu expressivamente todo o glicerol presente no meio até final do processo fermentativo.

Bhosale e Gadre (2002) afirmaram que a temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes que influenciam o crescimento e o desenvolvimento dos micro-organismos, causando alterações em muitas vias biossintéticas, inclusive na carotenogênese. A temperatura exerce controle na concentração de enzimas envolvidas na produção de carotenoides, controlando, portanto o nível de carotenoides acumulados pelos micro-organismos. Em seu trabalho a temperatura e as condições de iluminação para o aumento da produção de  $\beta$ -caroteno por um mutante de *Rhodotorula glutinis* foram estudados. De acordo com os resultados obtidos pelos autores, a temperatura ótima de crescimento e produção de carotenoides ocorreu a 30 °C e sob iluminação constante de 1000 lux, sob essas condições o teor de  $\beta$ -caroteno aumentou 58 %.

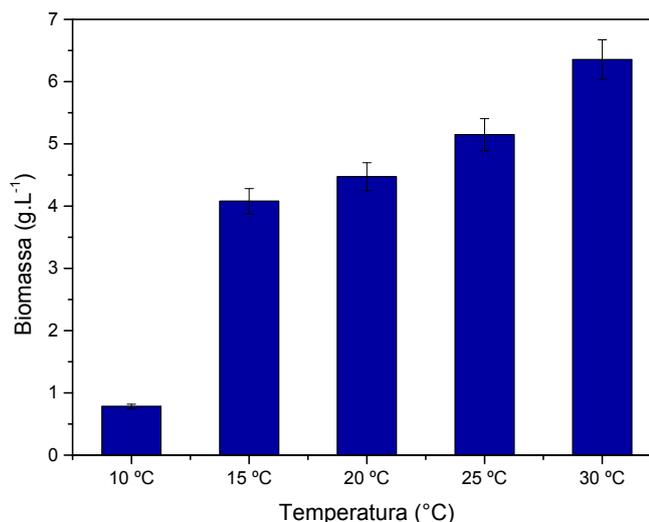
A produtividade em biomassa do processo fermentativo, submetido a diferentes temperaturas, é apresentada na Figura 20. A maior produtividade em biomassa foi verificada nos cultivos realizados a 30 °C. O valor máximo alcançado foi de  $0,07 \pm 0,003 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ , constatado em 48 horas de fermentação. Nas demais temperaturas de incubação, a produtividade não ultrapassou  $0,04 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ .



**Figura 20** – Produtividade em biomassa por *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 sob diferentes temperaturas de incubação 10 °C (▲), 15 °C (●), 20 °C (◆), 25 °C (■) e 30 °C (▼) em biorreator de bancada de 3 L a 150 rpm

A Figura 21 mostra a produção de biomassa com 144 h de fermentação, sob diferentes temperaturas de crescimento. A temperatura ótima de crescimento observada foi a 30 °C. As temperaturas de incubação de 15 e 20 °C exibiram um perfil de crescimento muito similar, entretanto, notou-se que à medida que ocorreu um aumento de temperatura, maiores concentrações de biomassa foram detectadas.

Zhang et al. (2014), avaliando a produção de carotenoides por *Rhodotorula glutinis*, em diferentes temperaturas, ressaltam que temperaturas elevadas ( $\sim 44 \text{ °C}$ ) e baixas ( $\sim 18 \text{ °C}$ ) inibem a taxa de crescimento específico, a taxa de produção de biomassa e a taxa de utilização de nutrientes pela levedura. Os autores pontuam que os melhores resultados foram alcançados em processos fermentativos conduzidos a 30 °C. Valduga et al. (2009), em uma revisão de literatura sobre a produção biotecnológica de carotenoides, afirmam que temperaturas acima de 30 °C afetam a produção de carotenoides, uma que interferem na atividade ótima das enzimas envolvidas na síntese de carotenoides.



**Figura 21** – Produção de biomassa em 144 horas de fermentação por *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 sob diferentes temperaturas de incubação (10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C e 30 °C) em biorreator de bancada de 3 L a 150 rpm

Avaliou-se também neste ensaio experimental a concentração de carotenoides produzidos por *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 para cada temperatura estabelecida. Porém, devido à ausência de pigmentação característica dos carotenoides, aliado a uma menor produção de biomassa, não foi possível quantificar os carotenoides totais a 10 °C.

Levando-se em consideração as dificuldades na extração de carotenoides de espécies *Rhodotorula*, o que sinaliza a literatura consultada e que *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 inicia a fase estacionária de crescimento a partir de 96 h, estabeleceu-se que os carotenoides totais seriam determinados a partir de 120 h do processo fermentativo. Alguns autores mencionam que a produção de carotenoides por espécies *Rhodotorula* ocorre após 80-90h do processo fermentativo. Petrik et al. (2013) e Marova et al. (2012) avaliando a produção de carotenoides, em biorreator com diversos micro-organismos, incluindo a *Rhodotorula glutinis*, observaram que a produção máxima de carotenoides foi obtida após 80-90 h de fermentação. Marova et al. (2011) demonstraram em seu trabalho que a máxima produção  $\beta$ -caroteno foi obtida em cultivos com linhagens em fase estacionária, após 80 h de fermentação. Maldonade et al. (2012) observaram uma máxima concentração de carotenoides após 120 h de fermentação utilizando linhagens de *Rhodotorula mucilaginosa*, isoladas do ecossistema brasileiro. Schneider et al. (2013) avaliaram a produção de carotenoides por *Rhodotorula glutinis* ATCC 15125 em meios contendo efluentes de cervejaria combinado com outras fontes de carbono como glicose e açúcar comercial. A maior produção de carotenoides foi obtida com 168 h de fermentação em todos os meios de cultura avaliados. Aksu e Eren (2007) testando diferentes resíduos agroindustriais, como fontes de carbono,

observaram que a produção máxima de carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa* ocorreu no final da fase estacionária com 240 h de fermentação.

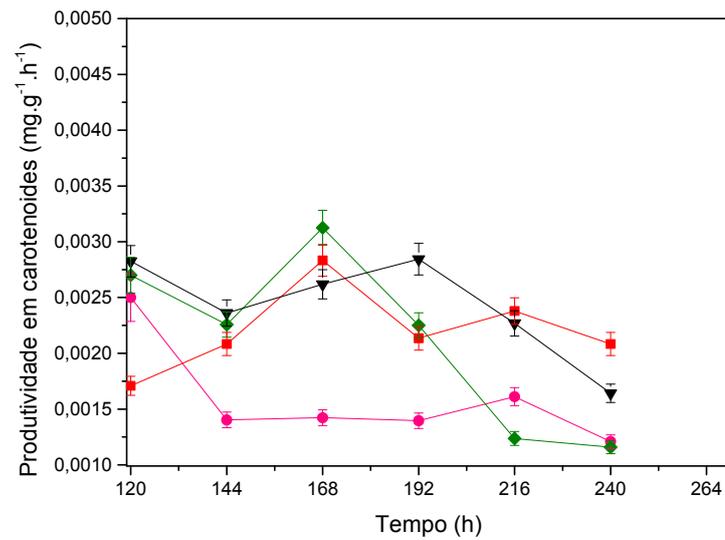
A produção de carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 em diferentes temperaturas de incubação é apresentada na Tabela 4.

**Tabela 4** – Produção de carotenoides em (mg.g<sup>-1</sup>) por *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 a partir de 120 horas de fermentação sob diferentes temperaturas de incubação (15 °C, 20 °C, 25 °C e 30 °C) em biorreator de bancada de 3 L a 150 rpm

Tempo (h)	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C
120	0,515 ± 0,02	0,386 ± 0,01	0,205 ± 0,01	0,339 ± 0,01
144	0,202 ± 0,01	0,325 ± 0,02	0,300 ± 0,01	0,340 ± 0,01
168	0,239 ± 0,01	0,525 ± 0,02	0,476 ± 0,02	0,440 ± 0,02
192	0,268 ± 0,01	0,432 ± 0,02	0,410 ± 0,02	0,546 ± 0,02
216	0,348 ± 0,01	0,267 ± 0,01	0,514 ± 0,02	0,490 ± 0,02
240	0,290 ± 0,01	0,278 ± 0,01	0,500 ± 0,02	0,394 ± 0,01

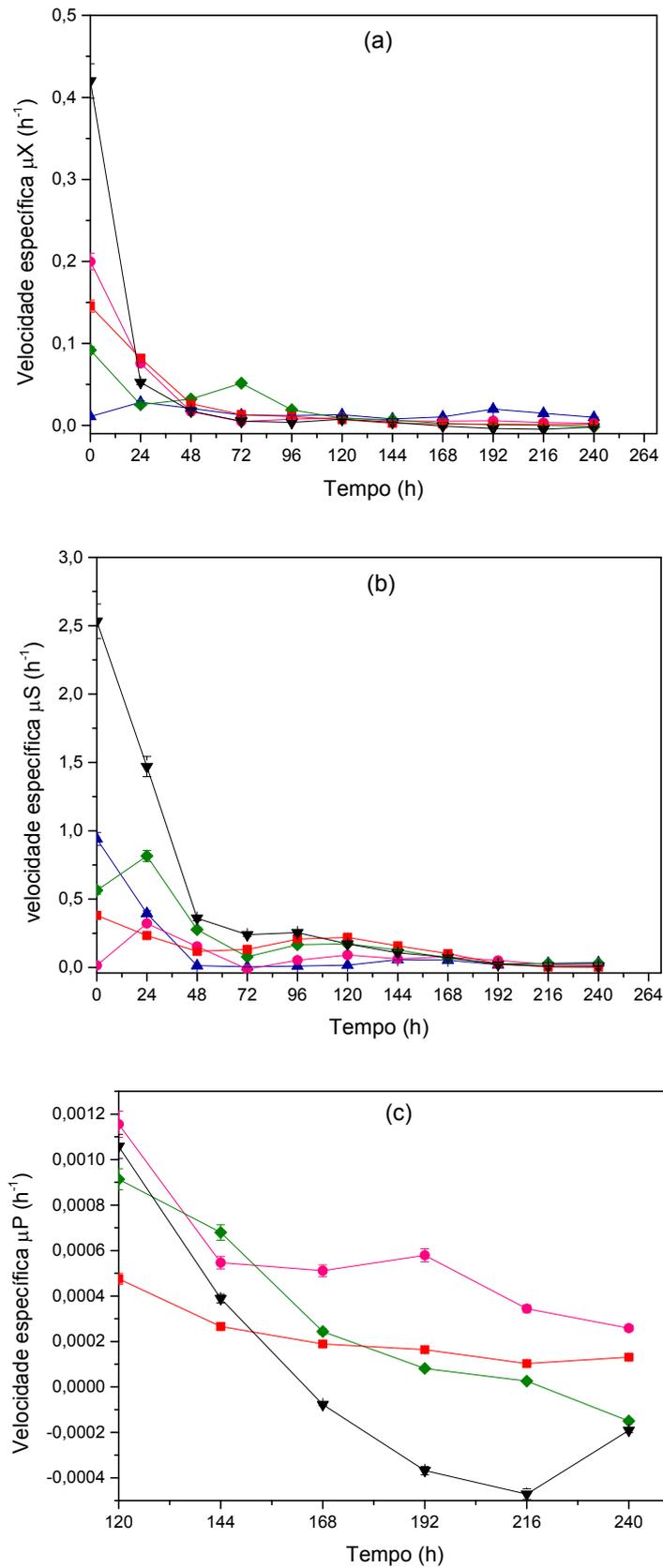
As determinações de carotenoides foram realizadas a partir de 120 h até o final do processo fermentativo. Desta forma, a maior produção de carotenoides (0,546 ± 0,02 mg.g<sup>-1</sup>) foi observada a 30 °C em 192 h de fermentação. A fermentação conduzida a 20 °C apresentou produção semelhante de carotenoides (0,525 ± 0,02 mg.g<sup>-1</sup>) com 168 h de fermentação. O cultivo incubado a 15 °C registrou a menor produção de carotenoides (0,202 ± 0,01 mg.g<sup>-1</sup>) em 144 h de fermentação. Em todas as condições avaliadas é interessante apontar que os picos de produção de carotenoides não coincidiram com as maiores determinações de biomassa.

A produtividade em carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164, em função de diferentes temperaturas de incubação, é apresentada na Figura 22. As maiores produtividades em carotenoides foram verificadas nos cultivos realizados a 20 e 30 °C. Os valores máximos alcançados nos processos conduzidos a 20 e 30°C foram 0,0031 ± 1,56E<sup>-4</sup> mg.g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> (em 168 h) e 0,0029 ± 1,41E<sup>-4</sup> mg.g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> (em 120 h), respectivamente.



**Figura 22** – Produtividade em carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 sob diferentes temperaturas de incubação 15 °C (●), 20 °C (◆), 25 °C (■) e 30 °C (▼) em biorreator de bancada de 3 L a 150 rpm

Na Figura 23 são apresentados os resultados de velocidades específicas de produção de biomassa ( $\mu X$ ), consumo de glicerol ( $\mu S$ ) e carotenoides ( $\mu P$ ) nas diferentes condições experimentais avaliadas.



**Figura 23** – Velocidades específicas para a produção de biomassa (A), consumo de glicerol (B) e produção de carotenoides (C) por *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 sob diferentes temperaturas de incubação 10 °C (▲), 15 °C (●), 20 °C (◆), 25 °C (■) e 30 °C (▼) em biorreator de bancada de 3 L a 150 rpm.

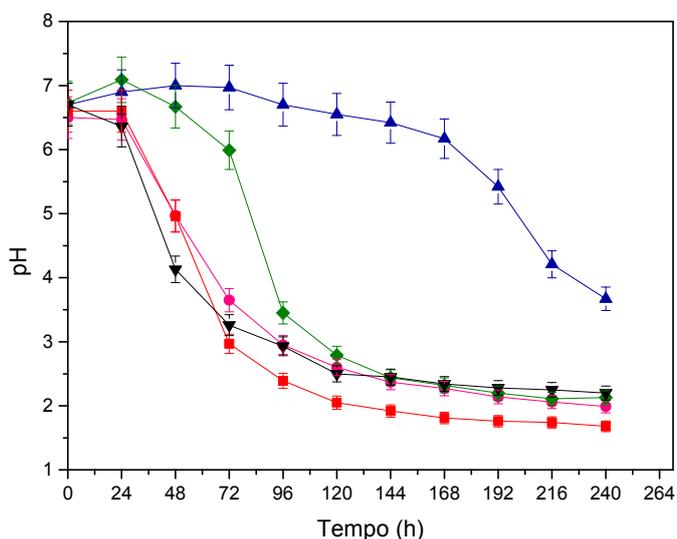
Em todas as temperaturas investigadas, verificou-se que os perfis das velocidades para biomassa, glicerol e carotenoides sugerem uma tendência ao metabolismo secundário, típico em fermentações com *Rhodotorula* para produzir carotenoides. Em todas as temperaturas de cultivo avaliadas, as velocidades específicas de consumo de glicerol ( $\mu\text{S}$ ) começam a sofrer queda acentuada partir de 48 h, permanecendo relativamente baixas até o fim do processo fermentativo. Em contrapartida, as respectivas velocidades específicas de produção de carotenoides ( $\mu\text{P}$ ) atingem o pico em 120 h. Verificou-se também que para a velocidade específica de produção de biomassa ( $\mu\text{X}$ ) e consumo de substrato ( $\mu\text{S}$ ), as maiores valores foram obtidos a 30 °C. Para a velocidade específica de produção de carotenoides ( $\mu\text{P}$ ), a queda da temperatura de 25 para 15 °C favoreceu o aumento do valor da velocidade específica máxima, de 0,00047 h<sup>-1</sup> a 25 °C para 0,00116 h<sup>-1</sup> a 15 °C. Valor muito próximo foi alcançado nos cultivos conduzidos a 30 °C (0,00106 h<sup>-1</sup>).

Como destacam Marova, Certik e Breierova (2011) e Mata-Gómez et al. (2014), metabolismo secundário é um termo para vias de metabolismo que não são absolutamente necessárias para a sobrevivência do organismo. A indução do metabolismo secundário está ligada a determinadas condições ambientais ou estádios de desenvolvimento. Quando os nutrientes estão esgotados, os micro-organismos começam a produzir uma variedade de metabolitos secundários, a fim de promover a sobrevivência. O acúmulo de pigmento carotenoide na maioria das leveduras tem início na fase logarítmica tardia e continua na fase estacionária (metabólitos tipicamente secundários), bem como, a presença de uma fonte de carbono adequada é importante para a biossíntese de carotenoides durante a fase em que não há crescimento.

Echavarri-Erasun e Johnson (2002) reforçam as afirmações dos autores anteriores, ao discorrerem que espécies de fungos são frequentemente descritas como fontes de produtos secundários do metabolismo, bem como, os organismos utilizados na produção de alimentos para seres humanos. A síntese de pigmentos carotenoides em leveduras começa durante a fase logarítmica tardia e continua na fase estacionária, na presença de uma fonte de carbono de confiança para a biossíntese de carotenoides durante a fase estacionária. Para Tkáčová et al. (2015), o gênero *Rhodotorula* se caracteriza pela produção de glicogênio metabólico durante a fase exponencial de crescimento e pela produção de grandes quantidades de pigmentos e lipídeos durante a fase estacionária.

O pH foi também avaliado durante os processos fermentativos, conduzidos sob diferentes temperaturas (Figura 24). O comportamento do pH para todos os processos fermentativos da *R. mucilaginosa* CMIAT 164 foram similares, exceto para o processo

conduzido a 10 °C. Nesta temperatura o micro-organismo apresentou menor produção de biomassa e consumo mais lento do glicerol, conseqüentemente apresentou uma menor variação do pH ao longo do processo fermentativo.



**Figura 24** – Perfil de pH por *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 sob diferentes temperaturas de incubação 10 °C (▲), 15 °C (●), 20 °C (◆), 25 °C (■) e 30 °C (▼) em biorreator de bancada de 3 L a 150 rpm

Com relação aos demais ensaios, percebeu-se uma queda brusca do pH entre 24 e 96 h de fermentação. Após esse período, o pH manteve-se constante, em torno de 3,0, até a finalização do processo fermentativo. Saenge et al. (2011), realizando ensaios com *Rhodotorula glutinis* para a produção de carotenoides, utilizando glicerol bruto como fonte de carbono, demonstraram que o pH do meio de cultura diminuiu de 6,0 para 4,3 utilizando reatores de 2L sem controle de pH. Os autores indicam que a queda do pH ocorreu provavelmente pela produção de ácidos orgânicos pela levedura. Tal constatação pode ser reforçada pelos valores de pH detectados nos cultivos a 15 °C. Nessa condição foi determinada a menor produção de biomassa ( $2,66 \pm 0,33 \text{ g.L}^{-1}$ ) com valores de pH, que oscilaram entre 5 e 6, durante praticamente todo processo fermentativo. Sinalizando, que no referido ensaio experimental, a baixa produção de biomassa não repercutiu na síntese de ácidos orgânicos, responsáveis pela queda nos valores de pH do meio de fermentação.

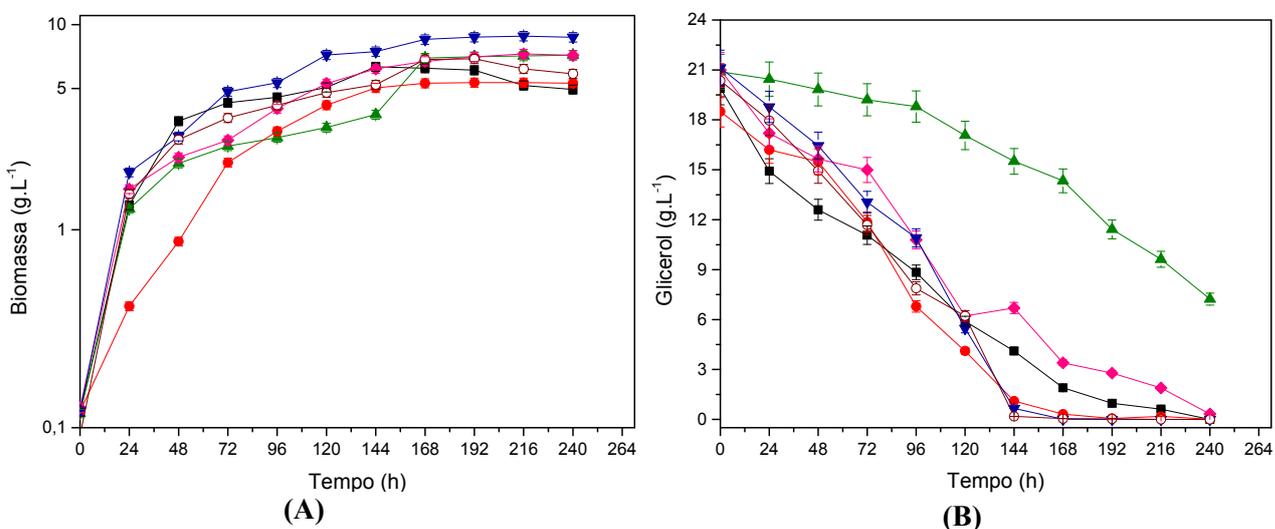
#### **4.6 Influência do pH na produção da levedura carotenogênica**

Para investigar a influência do pH na produção de carotenoides estabeleceram-se as condições operacionais anteriores e a temperatura de condução do processo a 30 °C. Além da temperatura, o pH também interfere diretamente no desempenho dos micro-organismos durante os processos fermentativos. Schmidell (2001) e Lima e Mota (2003) afirmaram que a escolha dos valores de temperatura e pH deve ser criteriosa e, de acordo com o metabolismo microbiano. Tais variáveis influenciam diretamente na atividade microbiana, podendo contribuir tanto para estabelecer condições seletivas, minimizando possíveis contaminações, como também podem afetar a morfologia da célula e indiretamente interferir na produtividade do processo.

Nesta etapa avaliou-se o desempenho da *R. mucilaginosa* CMIAT 164 na produção de biomassa, consumo de glicerol e carotenoides ao manter-se o pH constante em 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0 durante todo o processo fermentativo. O perfil da produção de biomassa e o consumo de glicerol sob diferentes controles de pH do processo fermentativo está ilustrado na Figura 25. A maior produção de biomassa ( $8,85 \pm 0,4 \text{ g.L}^{-1}$ ) a 216 h de processo foi verificada quando a fermentação foi controlada em pH 6. Comparativamente, a concentração de biomassa na fermentação sem controle não ultrapassou  $5,17 \text{ g.L}^{-1}$ . Luo et al. (2013) estudando o impacto do controle de pH na produção de biomassa de leveduras em biorreator, empregando glicose como fonte de carbono no meio fermentação, observaram efeito similar ao aqui demonstrado. Os autores constataram que o controle de pH em valores mais elevados favoreceu o crescimento celular e o consumo da fonte de carbono. No processo fermentativo conduzido por Luo et al. (2013), em pH 7 (o maior valor controlado), a concentração de biomassa foi a maior obtida ( $13,8 \pm 0,63 \text{ g.L}^{-1}$ ).

A partir de 120 h de fermentação o crescimento da levedura manteve-se constante até o final do processo (Figura 25A). Produção de biomassa, semelhante a desse estudo, foi encontrado por Papanikolaou et al. (2008) utilizando *Mortierella isabellina*, cultivado em biorreator (batelada simples), com produção de  $8,5 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa quando empregou-se glicerol bruto como fonte carbono. Observando as condições de crescimento utilizadas por Malisorn e Suntornsuk (2008), com o gênero *Rhodotorula*, a melhor produção de  $\beta$ -caroteno por *R. glutinis* DM28 em biorreator, empregando salmoura de rabanete, ocorreu em processos fermentativos conduzidos a 30 °C, com controle de pH em 6 e a 150 rpm. No presente

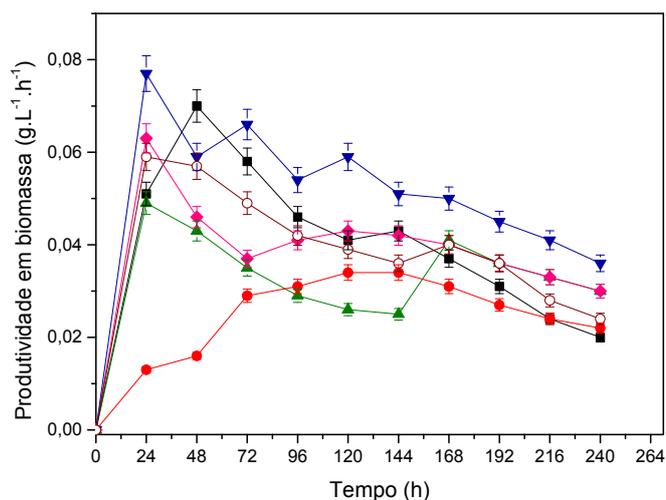
trabalho, com *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164, os parâmetros ótimos de temperatura, pH e agitação foram os mesmos da investigação anteriormente citada.



**Figura 25** – Produção de biomassa (A) e Consumo de glicerol (B) por *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 sob diferentes controles de pH 3,0 (▲), 4,0 (●), 5,0(◆), 6,0 (▼), 7,0 (○) e sem ajuste de pH - controle (■) em biorreator de bancada de 3 L a 30 °C e 150 rpm

Avaliando os perfis do consumo de glicerol da Figura 25B, foi possível perceber que a *R. mucilaginosa* CMIAT 164 ao ser submetida a diferentes pHs de cultivo, apresentou valores de consumo semelhantes, com exceção do experimento conduzido em pH 3, que ao final do processo fermentativo apresentou glicerol bruto acumulado no meio ( $7,23 \pm 0,3 \text{ g. L}^{-1}$ ). Observando os perfis das curvas de consumo de glicerol dos experimentos conduzidos em pH 4,0; 6,0 e 7,0, verificou-se o esgotamento da fonte de carbono a partir de 144 h de fermentação. Em contrapartida, o experimento controle (sem ajuste de pH), neste mesmo intervalo de tempo, apresentava glicerol disponível ( $4,11 \pm 0,2 \text{ g.L}^{-1}$ ). De acordo com os dados apresentados neste ensaio experimental, os melhores valores observados de produção biomassa, carotenoides e consumo de glicerol bruto, foram quando se controlou o pH do processo fermentativo em 6, adicionando hidróxido de sódio como reagente de equilíbrio do pH.

A produtividade em biomassa dos processos fermentativos, submetidos a diferentes controles de pH, é verificado na Figura 26. Em termos de produtividade, a fermentação conduzida em pH 6,0 foi mais eficiente (próximo de  $0,08 \pm 0,003 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ). O pico de produção foi verificado com 24 horas de fermentação. A menor produtividade em biomassa ( $0,03 \pm 0,002 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) foi registrada em 144 h de fermentação, ao controlar-se o pH em 4,0.



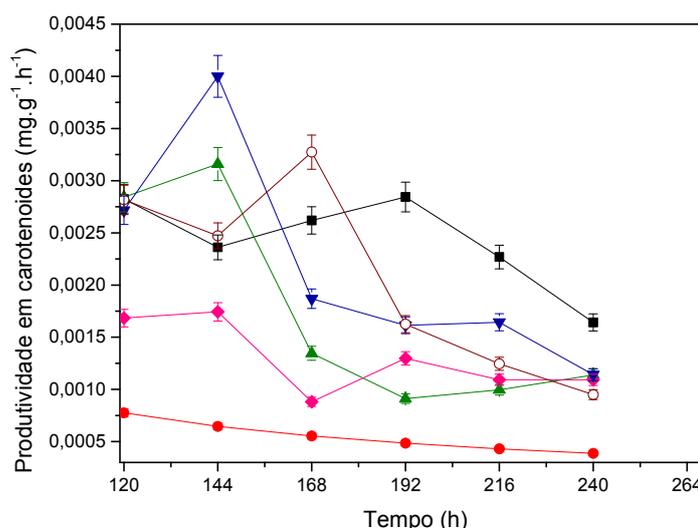
**Figura 26** – Produtividade em biomassa por *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 sob diferentes controles de pH 3,0 (▲), 4,0 (●), 5,0 (◆), 6,0 (▼), 7,0 (○) e sem ajuste de pH - controle (■) em biorreator de bancada de 3 L a 30 °C e 150 rpm

A produção de carotenoides por *R. mucilaginosa* CMIAT 164 foi avaliada sob diferentes controles de pH (Tabela 5). As maiores determinações de carotenoides foram verificadas nas fermentações que apresentavam controle de pH em 6,0 e 7,0. O experimento controle apresentou produção máxima de  $0,546 \pm 0,02$  mg.g<sup>-1</sup> de carotenoides em 192 h de fermentação, enquanto a fermentação conduzida em pH 6 apresentou maior produção de  $\beta$ -caroteno ( $0,576 \pm 0,02$  mg.g<sup>-1</sup>) e foi verificada em 144 h de fermentação. Já a fermentação conduzida em pH 7 produziu  $0,550 \pm 0,02$  mg.g<sup>-1</sup> de  $\beta$ -caroteno em 168 h de fermentação. No estudo de Valduga et al. (2009) a levedura *Sporobolomyces ruberrimus* apresentou mudanças sobre o conteúdo de carotenoides quando alterou-se o pH inicial do meio. A carotenogênese e o crescimento foram induzidos pela elevação do pH de 3,5 a 6,0, sendo o pH 6,0 ótimo para o crescimento celular e formação de pigmento (38,7 mg.L<sup>-1</sup>). Similarmente, no estudo aqui apresentado, o controle de pH em 6 no meio contendo glicerol bruto favoreceu o aumento da produção de carotenoides. Aksu e Eren (2007) também demonstraram que as maiores produções de carotenoides por *Rhodotorula glutinis* foram obtidas em pH 6 e a concentração máxima de biomassa foi atingida nos experimentos conduzidos com pH inicial de 6,5.

**Tabela 5** – Produção de carotenoides em ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) por *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 a partir de 120 horas de fermentação sob diferentes controles de pH (3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e sem ajuste de pH – controle) em biorreator de bancada de 3 L a 30 °C e 150 rpm

Tempo (h)	Controle (sem ajuste de pH)	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
120	0,339 ± 0,01	0,341 ± 0,01	0,09 ± 0,005	0,202 ± 0,01	0,326 ± 0,01	0,338 ± 0,01
144	0,340 ± 0,01	0,455 ± 0,02	0,213 ± 0,01	0,251 ± 0,01	0,576 ± 0,02	0,356 ± 0,01
168	0,440 ± 0,02	0,226 ± 0,01	0,256 ± 0,01	0,148 ± 0,007	0,314 ± 0,01	0,550 ± 0,02
192	0,546 ± 0,02	0,175 ± 0,01	0,320 ± 0,01	0,249 ± 0,01	0,310 ± 0,01	0,312 ± 0,01
216	0,490 ± 0,02	0,215 ± 0,01	0,068 ± 0,003	0,236 ± 0,01	0,355 ± 0,01	0,269 ± 0,01
240	0,394 ± 0,01	0,273 ± 0,01	0,102 ± 0,005	0,262 ± 0,01	0,274 ± 0,01	0,228 ± 0,01

A produtividade em carotenoides por *R. mucilaginosa* CMIAT 164, sob diferentes controles de pH, é apresentada na Figura 27. Observando todas as condições experimentais, a maior produtividade em carotenoides ( $0,004 \pm 2\text{E}^{-4} \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) foi obtida em 144 h de fermentação quando controlou-se o pH em 6.

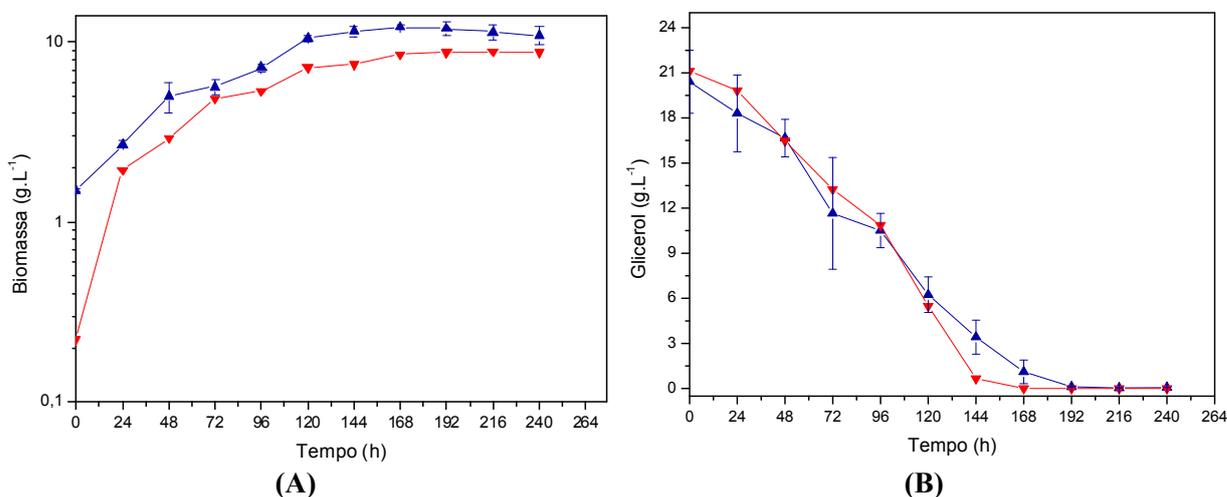


**Figura 27** – Produtividade em carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 sob diferentes controles de pH 3,0 (▲), 4,0 (●), 5,0 (◆), 6,0 (▼), 7,0 (○) e sem ajuste de pH - controle (■) em biorreator de bancada de 3 L a 30 °C e 150 rpm

#### 4.7 Influência do aumento do volume de inóculo no processo fermentativo

O aumento da concentração de inóculo de *R. mucilaginosa* CMIAT 164 nos meios de fermentação foi avaliado nessa etapa da investigação. O perfil da curva de crescimento da *R. mucilaginosa* CMIAT 164 nas diferentes condições é apresentado na (Figura 28A). A injeção de maiores concentrações de inóculo no biorreator repercutiu no perfil de crescimento de *R.*

*mucilaginoso* CMIAT 164, claramente houve aumento na produção de biomassa. Registrou-se produção de  $12,12 \pm 0,2 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa em 168 h de fermentação. O percentual de aumento, comparando o experimento controle, foi próximo de 30%.



**Figura 28** – Produção de biomassa (A) e Consumo de glicerol (B) por *Rhodotorula mucilaginoso* CMIAT 164 em volume de inóculo  $2,0 \text{ g.L}^{-1}$  (▲) e inóculo de  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  - controle (▼) em biorreator de bancada de 3 L a  $30^\circ\text{C}$  e 150 rpm

As curvas de consumo de glicerol bruto foram similares (Figura 28B). Observou-se que nos experimentos inoculados com  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  de levedura, o esgotamento do glicerol bruto ocorreu mais rapidamente, exaurindo-se em 144 h de fermentação. O esgotamento do glicerol bruto na dorna inoculada com  $2,0 \text{ g.L}^{-1}$  de levedura foi registrado após 192 h de fermentação.

A Tabela 7 apresenta o perfil de carotenoides sintetizados pela levedura durante o processo fermentativo. A fermentação conduzida com inóculo de  $2,0 \text{ g.L}^{-1}$  apresentou valor máximo de produção de carotenoides ( $0,514 \pm 0,01 \text{ mg.g}^{-1}$ ) em 192 h de fermentação. Embora a fermentação controle tenha registrado a maior produção de carotenoides ( $0,576 \pm 0,02 \text{ mg.g}^{-1}$ ) em 144 h de fermentação, observou-se, de um modo geral, que a produção de carotenoides foi sutilmente melhor nos experimentos inoculados com  $2,0 \text{ g.L}^{-1}$  de massa seca. O aumento da concentração de inóculo provavelmente interferiu na transferência de massa em relação ao substrato, produto e oxigênio. Além disso, não houve alteração de parâmetros do processo fermentativo tais como o sistema agitação e aeração, que fornece oxigênio para a manutenção da atividade respiratória de um certo conjunto de células e desempenha um papel importante na taxa de crescimento e produção carotenoides.

**Tabela 6** – Produção de carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 em fermentação com inóculo de 2,0 g.L<sup>-1</sup> (▲) e controle (▼) em biorreator de bancada de 3 L a 30 °C e 150 rpm

Tempo (h)	Controle	Inóculo de 2,0 g.L <sup>-1</sup>
120	0,326 ± 0,01	0,296 ± 0,01
144	0,576 ± 0,02	0,321 ± 0,01
168	0,314 ± 0,01	0,355 ± 0,02
192	0,310 ± 0,01	0,514 ± 0,01
216	0,355 ± 0,01	0,388 ± 0,02
240	0,274 ± 0,01	0,375 ± 0,007

O aumento do volume de inóculo proporcionou um pequeno aumento na concentração de biomassa em relação ao experimento controle, porém, não impactou consideravelmente no aumento da produção de carotenoides e no consumo do glicerol bruto. Possivelmente o aumento da concentração de inóculo, mantendo constante o oxigênio dissolvido em torno de 1 vvm, não mostrou-se adequado ao processo. De acordo com Schimidell et al. (2011), ao abordarem bases teóricas que permitem o estudo de transferência de oxigênio do ar para o meio líquido e estudos sobre a respiração microbiana, preconizam que células que estejam crescendo em alta velocidade tendem apresentar elevada velocidade de consumo da fonte de carbono, assim como elevada velocidade de respiração. Demonstrando assim que para suprir as necessidades metabólicas de um maior volume de inóculo, seria necessário aumentar a quantidade de oxigênio dissolvido.

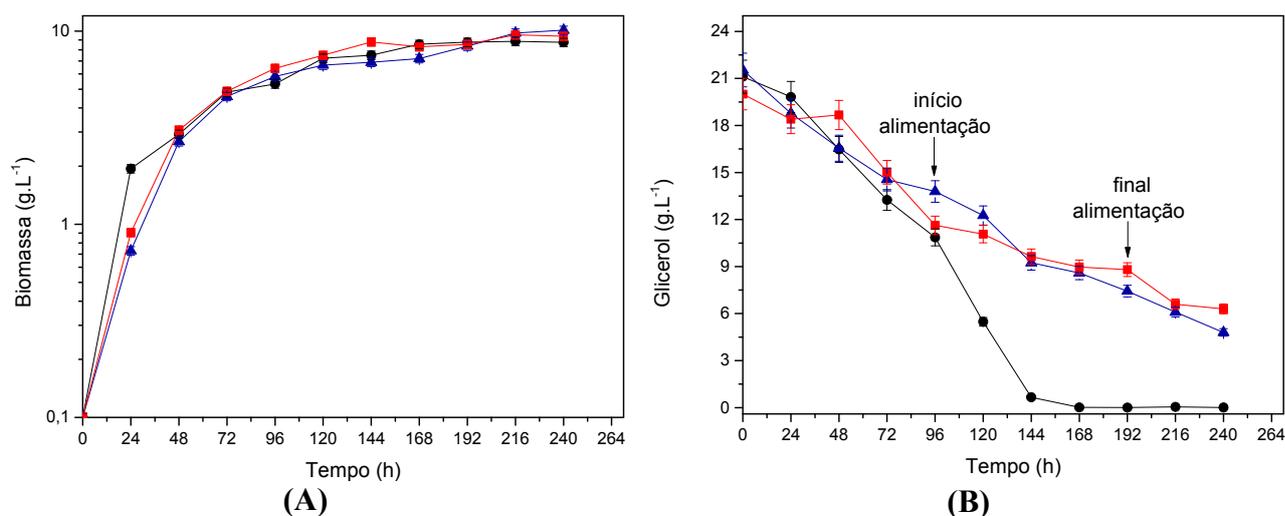
Malisorn e Suntornsuk (2008) avaliaram a otimização da produção de β-caroteno por *R. glutinis*, em meio contendo salmoura de rabanete, através dos parâmetros pH, temperatura e oxigênio dissolvido. Os autores afirmaram que um aumento no percentual de oxigênio dissolvido desencadeou aumento na produção de biomassa e de β-caroteno em cultivos com *R. glutinis* DM28. O suprimento de oxigênio durante o processo fermentativo possui uma forte influência nas atividades respiratórias e atividades enzimáticas da levedura. A aeração é um parâmetro importante, uma vez que a carotenogênese é um processo aeróbio e a taxa de fluxo de ar sobre a cultura de levedura é um fator essencial para a assimilação do substrato, taxa de crescimento celular e carotenogênese (MATA-GÓMEZ et al., 2014).

#### 4.8 Testes preliminares da alimentação do biorreator

A fim de aumentar viabilidade do processo fermentativo foram realizados dois testes preliminares de alimentação nos biorreatores. As condições de 30 °C e pH 6 foram utilizadas em ambos os experimentos. Em um dos ensaios, a dorna foi alimentada com meio de cultivo FCC (composição em g.L<sup>-1</sup>: 64,0 de glicerol bruto; 1,0 de extrato de levedura; 1,0 de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 5,0 de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 0,5 de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) contendo somente fonte de carbono concentrada. Num segundo ensaio, a dorna foi alimentada com meio de cultivo MCC (composição em g.L<sup>-1</sup>: 64,0 de glicerol bruto; 3,2 de extrato de levedura; 3,2 de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 16,0 de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 1,6 de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), onde todos os constituintes do meio de fermentação foram concentrados. A alimentação da dorna teve início a partir de 96 h e foi alimentada com 125 mL de meio por dia, durante 4 dias seguidos, até 192 h de fermentação.

A Figura 29 mostra o perfil das curvas do consumo de glicerol e concentração de biomassa por *R. mucilaginosa* CMIAT 164 em biorreator durante 240 h de fermentação nas diferentes condições de alimentação.

Avaliando o perfil das curvas de crescimento da Figura 29A, foi possível perceber que a alimentação do biorreator não repercutiu em mudanças no perfil de biomassa quando compara-se a fermentação controle. As concentrações de biomassa determinadas foram semelhantes para todas as condições analisadas. Os maiores valores de biomassa obtidos foram registrados no final de 240 h de fermentação, apresentando  $8,75 \pm 0,4$  g.L<sup>-1</sup>,  $10,1 \pm 0,5$  g.L<sup>-1</sup> e  $9,40 \pm 0,5$  g.L<sup>-1</sup> para os ensaios controle, FCC e MCC, respectivamente.



**Figura 29** – Produção de biomassa (A) e Consumo de glicerol (B) por *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 sob diferentes meios de alimentação: FCC (▲) e MCC (■) – a partir de 96 h e término em 192 h de fermentação e condição CONTROLE (●) em biorreator de bancada de 3 L a 30 °C e 150 rpm.

Avaliando o consumo de glicerol bruto (Figura 29B) por *R. mucilaginosa* CMIAT 164 durante os processos de batelada alimentada observou-se que a fonte de carbono no experimento controle esgotou-se em 144 h de fermentação. A alimentação dos biorreatores foi iniciada no fim da fase “log” de crescimento da levedura (96 h de processo) e prolongou-se até 192 h de fermentação. O perfil de consumo de glicerol bruto nas diferentes condições de alimentação (meio FCC e meio MCC) foram similares. Notou-se que a injeção de glicerol bruto nos biorreatores provocou queda na velocidade de consumo desse substrato pela linhagem. A concentração de glicerol residual presente no meio fermentado ao final de 240 h foi de  $4,8 \pm 0,2 \text{ g.L}^{-1}$  e  $6,30 \pm 0,3 \text{ g.L}^{-1}$  para as dornas alimentadas com meio FCC e MCC, respectivamente. É interessante destacar, que a presença da fonte de nitrogênio no meio MCC não repercutiu no perfil de consumo do glicerol bruto.

Com relação à produção de carotenoides pela levedura (Tabela 6), observou-se que a maior produção ocorreu na batelada controle em 144 h de fermentação ( $0,576 \pm 0,02 \text{ mg.g}^{-1}$ ). Nas bateladas alimentadas, a produção de carotenoides alcançou os maiores valores em 216 h de fermentação, na fase estacionária do processo fermentativo, registrando-se  $0,479 \pm 0,02 \text{ mg.g}^{-1}$  e  $0,340 \pm 0,01 \text{ mg.g}^{-1}$  para dornas alimentadas com meio FCC e MCC, respectivamente.

**Tabela 7** – Produção de carotenoides em (mg.g<sup>-1</sup>) por *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT164 sob diferentes meios de alimentação: FCC, MCC e condição CONTROLE em biorreator de bancada de 3 L a 30 °C e 150 rpm

Tempo (h)	Controle (sem alimentação)	Meio de Alimentação FCC	Meio de Alimentação MCC
120	0,326 ± 0,01	0,233 ± 0,01	0,168 ± 0,008
144	0,576 ± 0,02	0,234 ± 0,01	0,157 ± 0,008
168	0,314 ± 0,01	0,282 ± 0,01	0,276 ± 0,01
192	0,310 ± 0,01	0,305 ± 0,01	0,250 ± 0,01
216	0,355 ± 0,01	0,479 ± 0,02	0,340 ± 0,01
240	0,274 ± 0,01	0,152 ± 0,01	0,176 ± 0,009

Segundo Almanza et al. (2014) o glicerol bruto utilizado como única fonte de carbono e o sulfato de amônio como fonte de nitrogênio para a produção de carotenoides, a partir de *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159, aumentou o acúmulo de carotenoides. Os autores demonstraram produções de carotenoides em torno de 135,0 mg.L<sup>-1</sup>. Yen Wei et al. (2014) estudaram a influência da batelada alimentada sobre o crescimento de *Rhodotorula glutinis* em diferentes tipos de reatores utilizando glicerol bruto como fonte de carbono. O biorreator airlift de 50 L e o reator tanque agitado de 15 L foram alimentados até 120 h de fermentação. Os valores máximos de carotenoides obtidos, ao final do processo fermentativo, foram de 1.417 mg/g e 1.163 mg/g, respectivamente. Diferentemente, os dados aqui apresentados, sugerem que a presença da fonte de nitrogênio nos meios de alimentação não desencadeou um aumento na produção de carotenoides. Kitchia e Cheirsilp (2012) avaliaram um processo em batelada alimentada, com linhagens do gênero *Rhodotorula*, empregando diferentes meios de alimentações, preparados com sulfato de amônia e distintas concentrações de glicerol. A alimentação iniciou-se a partir de 60 h e foi repetida a cada 12 h até 120 h de fermentação. Os resultados demonstraram que houve um aumento considerável na produção de biomassa e lipídeos ao aumentar a concentração da fonte de carbono em 12%.

A alimentação do biorreator, em condições previamente estabelecidas, com meio de cultivo FCC e MCC proporcionou um pequeno aumento da biomassa celular, porém, provocou uma diminuição na produção de carotenoides pela levedura. Ao alimentar a dorna com meio de cultivo concentrado, variando-se principalmente a concentração da fonte de carbono, percebeu-se que ao final do processo fermentativo havia acúmulo desse substrato no meio de fermentação, o que possivelmente pode ter inibido o aumento da produção de biomassa celular e conseqüentemente a síntese de carotenoides. Já que a levedura em estudo é estritamente aeróbia, outro fator que deve ser levado em consideração é a concentração de muitos constituintes dissolvidos no líquido, que reduzem a concentração de saturação do oxigênio em relação ao valor observado para a água.

Schimidell et al. (2001) afirmam que o efeito do substrato se manifesta quando um valor alto da concentração inicial do substrato pode, ao invés de aproximar a velocidade específica de crescimento ( $\mu_x$ ) a máxima velocidade específica de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ), provocar efeito contrário, ocasionando uma inibição no crescimento celular. Os autores ainda afirmam que a concentração de oxigênio dissolvido em soluções saturadas, quando se dissolvem outras espécies químicas em um líquido, é reduzida. Além disso, os microorganismos, ao consumirem esses nutrientes ao longo do tempo, lançam produtos de metabolismo no meio, que modificam ainda mais composição química e conseqüentemente alteram a concentração de oxigênio dissolvido na saturação.

## CONCLUSÕES

O estudo demonstrou a aplicabilidade do glicerol bruto como fonte alternativa de carbono em processos biotecnológicos, constituindo uma fonte viável ao crescimento de leveduras carotenogênicas.

*Rhodotorula aurantiaca* URM 5726 apresentou melhor desempenho em produtividade em biomassa e produção de pigmentos carotenoides na etapa de seleção das leveduras empregando glicerol P.A como fonte de carbono.

Os resultados dos ensaios realizados em Erlenmeyers de 2L demonstraram o desempenho superior do glicerol bruto em comparação ao glicerol P.A nos testes realizados com *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 e *Rhodotorula aurantiaca* URM 5726.

A *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 e *Rhodotorula aurantiaca* URM 5726 foram capazes de tolerar as impurezas presentes no glicerol bruto e foram eficientes na bioconversão do glicerol bruto em biomassa rica em carotenoides.

A *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 apresentou melhor desempenho nos ensaios de tempo de propagação do inóculo e foi selecionada para os experimentos posteriores realizados em biorreatores.

A síntese de biomassa, o consumo de glicerol e a produção de carotenoides por *R. mucilaginosa* CMIAT 164, nos ensaios em biorreator, alcançaram valores satisfatórios quando controlou-se o pH em 6 e manteve-se a temperatura em 30 °C durante a condução do processo fermentativo.

O aumento da concentração do inóculo e as estratégias de alimentação do biorreator, nas condições avaliadas, não impactaram consideravelmente no aumento da produção de biomassa e carotenoides por *R. mucilaginosa* CMIAT 164.

De forma geral, os processos fermentativos conduzidos com o gênero *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 empregando o glicerol bruto para a produção de biomassa rica em carotenoides foram tecnicamente viáveis.

## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Nas fermentações realizadas em biorreatores, parâmetros operacionais tais como, agitação e aeração poderão ser aplicadas em diferentes combinações com a finalidade de aumentar a produção de biomassa e carotenoides.

Fermentações em regime alimentado poderão ser conduzidas após a otimização de parâmetros como agitação e aeração através de delineamento experimental.

Investigações sobre o estresse oxidativo de leveduras, durante a síntese de pigmentos carotenoides, poderão ser incorporadas aos novos estudos.

Novas combinações de meio de cultivo poderão ser empregadas para melhorar o processo fermentativo. Outras fontes alternativas de carbono (melaço de cana-de-açúcar, sacarose, soro de leite, xarope de milho e xarope de caju, etc.) poderão ser combinadas ao glicerol bruto para serem testadas.

O desempenho de diferentes fontes de nitrogênio poderá ser avaliada, através de delineamento experimental, em meios de cultivo contendo glicerol bruto para a produção de pigmentos carotenoides.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, S.; TURON, A. **Valorization of biodiesel derived glycerol as a carbon source to obtain added-value metabolites: Focus on polyunsaturated fatty acids.** *Biotechnology Advances*, v. 30, p. 733 – 741, 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCMBÚSTIVEIS (ANP). Disponível em: [www.aprobio.com.br/ANP-boletim setembro2014.pdf](http://www.aprobio.com.br/ANP-boletim_setembro2014.pdf). Acesso em 24 de outubro de 2014.

ASSOCIAÇÃO DOS PRODUTORES DE BODIESEL DO BRASIL (APROBIO). Disponível em: <http://www.aprobio.com.br/Boletim-DCR-080setembro2014.pdf>. Acesso em 24 de outubro de 2014.

AMERICAN SOCIETY OF TESTING AND MATERIALS. ASTM D6751 - 15a: **Standard Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels.** West Conshohocken, Pennsylvania, USA, p. 10, 2002.

AMARAL, P. F. F.; FERREIRA, T. F.; FONTES, G. C.; COELHO, M. A. Z. **Glycerol valorization: New biotechnological routes food and bioproducts processing,** v. 87, p. 179 – 186, 2009.

ALMANZA, A. H.; MONTANEZ, J. C.; GONZALEZ, M. A.; AVILA, C. M.; HERRERA, R. R.; AGUILAR, C. N. ***Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry.** *Food Bioscience*, v. 5, p. 64 – 72, 2014.

ALMEIDA, M. M. T. **Utilização do glicerol para obtenção de carotenoides de *Rhodotorula* sp. por fermentação submersa.** *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

ANDRE, A., DIAMANTOPOULOU, P., PHILIPPOUSSIS, A., SARRIS, D., KOMAITIS, M., PAPANIKOLAOU, S. **Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid,** *Industrial Crops and Products*, v. 31, p. 407–416, 2010.

AKSU, Z.; EREN, A.T. **Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: use of agricultural wastes as a carbon source.** *Process Biochemistry*, v. 40, p. 2985 – 2991, 2005.

AKSU, Z.; EREN, A.T. **Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis***, *Biochemical Engineering Journal*, v. 35, p. 107–113, 2007.

ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A. **Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica**. *Revista Analytica*, n. 26, 2007.

AYOUB, M.; ABDULLAH, A. Z. **Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry**. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, p. 2671 – 2686, 2012.

BERNADINO, V. M. P.; RODRIGUES, P. B.; ALBINO, L. F. T.; NAVES, L. P.; SCOTTA, B. A.; PEREIRA, C. M. C. **Metabolismo do Glicerol em Aves – Revisão Bibliográfica**. *REVISTA ELETRÔNICA NUTRITIME – ISSN 1983-9006*, v.10, n. 5, p. 2752 – 2780, 2013.

BHOSALE, P.; GRADE, R.V.  **$\beta$ -Carotene production in sugarcane molasses by a *Rhodotorula glutinis* mutant**. *Journal Ind Microbiol Biotechnol*, v. 26, p. 327 – 32, 2001.

BHOSALE, P.; GRADE, R.V. **Manipulation of temperature and illumination conditions for enhanced b-carotene production by mutant 32 of *Rhodotorula glutinis***. *Letters in Applied Microbiology*, v. 34, p. 349-353, 2002.

BHOSALE, P; **Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 63, p. 351 – 361, 2004.

BORIES, A.; CLARETA, C.; SOUCAILLE, P. **Kinetic Study and Optimization of the Production of Dihydroxyacetone from Glycerol using *Gluconobacter oxydans***. *Process Biochemistry*, v. 26, p. 243 – 248, 1991.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. **Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin**. *Bioresource Technology*, v. 71, p. 41 - 44, 1999.

BRANCO, L. S. C. **Estudo da ampliação de escala na produção de biomassa de *Rhodotorula* sp. CNPAT02 em processo batelada para obtenção de carotenoides**. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

CAMPOS, M. I.; FIGUEIREDO, T. V. B.; SOUSA, L. S.; DRUZIAN, J. I. **The influence of crude glycerin and nitrogen concentrations on the production of PHA by *Cupriavidus necator* using a response surface methodology and its characterizations.** *Industrial Crops and Products*, v. 52, p. 338 – 346, 2014.

CARVALHO, J.C. **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de pigmentos a partir de *Monascus* por fermentação em substrato sólido.** Tese Doutorado em Processos Biotecnológicos – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, 2004.

CHAGAS, A. L. **Produção de carotenoides e lipídeos pela microalga *Dunaliella tertiolecta* utilizando CO<sub>2</sub> de fermentação de cerveja.** Dissertação de Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos – Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

CHANG, G.; LUO, Z.; GU, S.; WUB, Q.; CHANG, M.; WANG, X.; **Fatty acid shifts and metabolic activity changes of *Schizochytrium* sp. S31 cultured on glycerol.** *Bioresouce Technology*, v. 142 p. 255 – 260, 2013.

CHATZIFRAGKOU, A.; MAKRI, A.; BELKA, A.; BELLOU, S.; MAVROU, M.; MASTORIDOU, M.; MYSTRIOTI, P.; ONJARO, G.; AGGELIS G.; PAPANIKOLAOU, S. **Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species.** *Energy*, v. 36, p. 1097 – 1108, 2011.

CHEIRSILP, B.; KITCHA, S.; TORPEE, S. **Co-culture of an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and a microalga *Chlorella vulgaris* for biomass and lipid production using pure and crude glycerol as a sole carbon source.** *Ann Microbiol*, v. 62, p. 987 – 993, 2012.

CHOUDHARI, S. M., ANANTHANARAYAN, L., SINGHAL, R. S. **Use of metabolic stimulators and inhibitors for enhanced production of b-carotene and lycopene by *Blakeslea trispora* NRRL 2895 and 2896.** *Bioresource Technology*, v. 99, p. 3166 - 3173, 2008.

CÜELIK E, OZBAY N, OKTAR N, CÜALIK P. **Use of biodiesel byproduct crude glycerol as the carbon source for fermentation processes by recombinant *Pichia pastoris*.** *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 47, p. 2985–2990, 2008.

CUTZU, R.; COI, A.; ROSSO, F.; BARDI, L.; CIANI, M.; BUDRONI, M.; ZARA, G.; ZARA, S.; MANNAZZU, I. **From crude glycerol to carotenoids by using a *Rhodotorula glutinis* mutant.** *World Journal Microbiol Biotechnology*, v. 29, p. 1009–1017, 2013.

EASTERLING, E. R.; FRENCH, W. T.; HERNANDEZ, R.; LICHA, M. **The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*.** *Bioresource Technology*, v. 100, p. 356 – 361, 2009.

ENRIQUEZ, H.A.; FERNANDEZ, I. M.; MOROYOQUI, P. G.; CERVANTES, J. M.; RAMIREZ, R. R. **Carotenoids extraction and quantification: a review. Analytical Methods**, v. 5, p. 2916–2924, 2013.

ECHAVARRI-ERASUN, C. & JOHNSON, E. A. **Fungal Carotenoids. Applied Mycology and Biotechnology**, v. 2, p. 45 – 85, 2002.

FRENGOVA, G. I., BESHKOVA, D. M., **Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. Journal Ind Microbiol Biotechnology**, v. 36 p.163–180, 2009.

FRENGOVA, G.; SIMOVA, E.; PAVLOVA, K.; BESHKOVA, D.; GRIGOROVA, D. **Formation of carotenoids by *rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 888-894, 1994. .

GONÇALVES, M.; MANTOVANI, M.; CARVALHO, W. A.; RODRIGUES, R.; MANDELLI, D.; ALBERO, J. S. **Biodiesel wastes: An abundant and promising source for the preparation of acidic catalysts for utilization in etherification reaction. Chemical Engineering Journal**, v. 256, p. 468–474, 2014.

IRAZUSTA, V.; PENALVERA, C. G. N.; CABRAL, M. E.; AMOROSO, M. J.; FIGUEROA, L. I. C. **Relationship among carotenoid production, copper bioremediation and oxidative stress in *Rhodotorula mucilaginosa* RCL-11. Process Biochemistry**, v. 48, p. 803 – 809, 2013.

KAYINGO, G.; MARTINS, A.; ANDRIE, R.; NEVES, L.; LUCAS, C.; WONG, B. **A permease encoded by *STL1* is required for active glycerol uptake by *Candida albicans* Microbiology**, v. 155, p. 1547 – 1557, 2009.

KAISER, P.; SURMAN, P.; VALLENTIN, G.; FUHRMANN H. **A small-scale method for quantitation of carotenoids in bacteria and yeasts Journal of Microbiological Methods**, v. 70, p. 142–149, 2007.

KIMURA, M.A. **A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution**, v.16, p.111-120, 1980

KITCHIA, S.; CHEIRSILP, B. **Enhancing Lipid Production from Crude Glycerol by Newly Isolated Oleaginous Yeasts: Strain Selection, Process Optimization, and Fed-Batch Strategy Bioenerg. Resource**, v. 6, p. 300 – 310, 2013.

LEMES, E. M. B. **Cinética da produção de  $\beta$ -caroteno por *Rhodotorula glutinis* EQ 5.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Bioquímica) – Faculdade em Química Industrial, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1992.

LIANG, Y., CUI, Y., TRUSHENSKI, J., BLACKBURN, J.W. **Converting crude glycerol derived from yellow grease to lipids through yeast fermentation, *Bioresource Technology***, v. 101, p. 7581–7586, 2010.

LIMA, N.; MOTA, M. **Biotecnologia – Fundamentos e aplicações**, 1ª Edição. Lisboa – Porto: Lidel, 2003, v.1, 256 p.

LIBIKIND, D.; BROCK, M.V. **Biomass and carotenoid pigment production by Patagonian native yeasts. *World Journal of Microbiology & Biotechnology***, v. 22, p. 687 - 692, 2006.

LIU, Y.; MEI, C.; KOH, J.; JI, L. **Bioconversion of crude glycerol to glycolipids in *Ustilago maydis*. *Bioresource Technology***, v. 102, p. 3927 – 3933, 2011.

LIU, X.; JENSEN P. R.; WORKMAN, M. **Bioconversion of crude glycerol feedstocks into ethanol by *Pachysolen tannophilus*. *Bioresource Technology***, v. 104, p. 579 – 586, 2012.

LUO, H.; NIU, Y.; DUAN, C.; SU, H.; YAN, G. **A pH control strategy for increased  $\beta$ -carotene production during batch fermentation by recombinant industrial wine yeast. *Process Biochemistry***, v. 48, p. 195 – 200, 2013.

MACHADO, W. R. C.; BURKET, J. F. M. **Influência da Temperatura na extração de carotenóides microbianos, *Revista de Engenharia e Tecnologia***, v. 6, n 3, p. 2916 – 2924, 2014.

MAKRI, A.; FAKAS, S.; AGGELIS, G. **Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures *Bioresource Technology***, v. 101, p. 2351 – 2358, 2010.

MALDONADE, I. R. **Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from Campinas region, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology***, v. 38, p. 65 – 70, 2007.

MALDONADE, I. R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SCAMPARINI, R. P. S. **Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. *Food Chemistry*** v. 107, p. 145 – 150, 2008.

MALDONADE, I. R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SCAMPARINI, A. R. P. **Statistical optimization of cell growth and carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa*. Brazilian Journal of Microbiology**, p. 109 - 115, 2012.

MALISORN, C.; SUNTORNSUK, W. **Optimization of  $\beta$ -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine. Bioresource Technology**, v. 99, p. 2281 – 2287, 2008.

MALISORN, C.; SUNTORNSUK, W. **Improved  $\beta$ -carotene production of *Rhodotorula glutinis* in fermented radish brine by continuous cultivation. Biochemical Engineering Journal**, v. 43, p. 27 - 32, 2009.

MANTZOURIDOU, F.; NAZIRINI, E.; TSIMIDOU, M. Z. **Industrial glycerol as a supplementary carbon source in the production of beta-carotene by *Blakeslea trispora*. Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 56, n. 8, p. 2668–2675, 2008.

MAROVA, I.; CERTIK, M.; BREIEROVA, E. **Production of Enriched Biomass by Carotenogenic Yeasts - Application of Whole-Cell Yeast Biomass to Production of Pigments and Other Lipid Compounds. Biomass – Detection, Production and Usage Dr. Darko Matovic (Ed.) ISBN: 978-953-307-492-4**, p. 345 – 383, 2011.

MAROVA, I.; CARNECKA, M.; HALIENOVA, A.; CERTIK, M.; DVORAKOVA, T.; HARONIKOVA, A. **Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. Journal of Environmental Management**, v.95, p. 338 – 342, 2012.

MATA-GOMEZ, L. C.; MONTAÑEZ, J. C.; MÉNDEZ-ZAVALA, A.; AGUILAR, C. N. **Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. Microbial Cell Factories**, v. 13, p. 1 -12, 2014.

MEINICKE, R. M. **Estudo da produção de pigmentos por *Monascus ruber* CCT3802 utilizando glicerol como substrato em cultivo submerso. Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

MELLENDEZ-MARTINEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. **Application of tristimulus colorimetry to estimate the carotenoids content in ultrafrozen orange juices. Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7266-7270, 2003.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. Secretaria de Petróleo, Gás Natural e Combustíveis Renováveis. Departamento de Combustíveis Renováveis. **Boletim Mensal dos Combustíveis Renováveis**, n 80, p. 22, 2014.

MOLINÉ, M.; LIBKIND, D.; BROOCK, M. **Production of Torularhodin, Torulene, and  $\beta$ -Carotene by *Rhodotorula* Yeasts Microbial Carotenoids From Fungi: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, DOI 10.1007/978-1-61779-918-1\_19, New York, v. 898, 2012.

MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C. **Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 639 -648, 2009.

MORRISON, L. R. **Glycerol. Encyclopedia of Chemical Technology. New York: Wiley**, p. 921-932, 1994.

MU, Y.; XIU, Z.; ZHANG, D. **A combined bioprocess of biodiesel production by lipase with microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*. Biochemistry Engineering Journal**, v. 40, p. 537 – 541, 2008.

NATIONAL BIODIESEL BOARD. Biodiesel Report, mar de 1996. Disponível em: <http://www.biodiesel.org>. Acesso em 24 de outubro de 2014.

NELIS, H. J., DE LEENHEER, A. P. **Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and Feeds. Journal of Applied Bacteriology**, v. 70, p. 181-191, 1991.

NICOL, R. W.; MARCHAND, K.; LUBITZ, W. D. **Bioconversion of crude glycerol by fungi Applied Microbiol Biotechnology**, v. 93, p. 1865 – 1875 DOI 10.1007/s00253-012-3921-7, 2012.

NITAYAVARDHANA, S.; KHANAL, S. K. **Biodiesel-derived crude glycerol bioconversion to animal feed: A sustainable option for a biodiesel refinery. Bioresource Technology**, v. 102, p. 5808 – 5814, 2011.

OCHOA-ESTOPIER, A., LESAGE, J., GORRET, N., GUILLOUET, S.E. **Kinetic analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* strain adapted for improved growth on glycerol: implications for the development of yeast bioprocesses on glycerol, Bioresource Technology**, doi:10.1016/j.biortech.2010.08.003, 2010.

OH, B.R.; SEO, J.W.; HEO, S.Y.; HONG, W.K.; LUO, L.H.; JOE, M.H.; KIM, C.H. **Efficient production of ethanol from crude glycerol by a *Klebsiella pneumonia* mutant strain.** *Bioresource Technology*, v. 102, n. 4, p. 3918 – 3922, 2011.

OLIVIER, J.; PALOU, A. **Chromatographic determination of carotenoids in foods.** *J. Chromatography*, v. 881, n. 1-2, p. 543 - 555, 2000.

PAPANIKOLAOU, S.; MUNIGLIA, L.; CHEVALOT, I.; AGGELIS, G.; MARC, I. ***Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol.** *Journal Application Microbiology*, v. 92, n. 4, p. 737 – 744, 2002.

PAPANIKOLAOU, S.; FAKAS, S.; FICK, M.; CHEVALOT, I.; PANAYOTOU, M. P.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. **Biotechnological valorization of raw glycerol discharged after biodiesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil.** *Biomass Bioenergy*, v. 32, p. 60 – 71, 2008.

PARK, P.K.; CHO, D.H.; KIM, E.Y.; CHU, K.H. **Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using statistical experimental design.** *World Journal Microbiol. Biotechnology*, v. 21, p. 429 – 434, 2005.

PARK, P.K.; KIMA, E.Y.; CHUB, K.H. **Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments.** *Separation and Purification Technology*, v. 53, p. 148 – 152, 2007.

PETRIK, S.; MAROVA, I.; HARONIKOVA, A.; KOSTOVOVA, I.; BREIEROVA, E. **Production of biomass, carotenoid and other lipid metabolites by several red yeast strains cultivated on waste glycerol from biofuel production – a comparative screening study.** *Annual Microbiology* DOI 10.1007/s13213-013-0617-x, 2013.

REGAL, P.; AMORIM-CARRILHO, K.T.; CEPEDA, A.; FENTE, C. **Review of methods for analysis of carotenoids,** *Trends in Analytical Chemistry*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2013.12.011>, 2014.

REHM, H. **Microbial production of glycerol and other polyols.** *Biotechnology Special microbial process*. Weinheim: VCH, v. 6B, p. 52-64, 1988.

RIVALDI, J. D.; SARROUH, B. F.; FIORILO, R.; SILVA, S. S. **Estratégias biotecnológicas para aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel.** *Revista de Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v.37, p. 44-51, 2008.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in food**. Campinas, São Paulo: International Life Sciences Institute (ILSI) 2001, v.1, 45 p.

RUBIO, A. L.; LAGARON, J. M. **Improved incorporation and stabilization of  $\beta$ -carotene in hydrocolloids using glycerol**. *Food Chemistry*, v. 125, p. 997 – 1004, 2011.

RYWINSKA, A.; RYMOWICZ, W.; WOJTATOWICZ, M. **Biosynthesis of citric acid from glycerol by acetate mutants of *Yarrowia lipolytica* in fed-batch fermentation**. *Food Technol Biotechnology*, v. 47, n. 1, p.1 – 6, 2010.

RYNWINSKA, A.; JUSZCZYK, P.; WOJTATOWICZ, M.; ROBAK, M.; LAZAR, Z.; TOMASZEWSKA, L.; RYMOWICZ, W. **Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications**. *Biomass and Bioenergy*, v. 48, p. 148 - 166, 2013.

SAENGE, C.; CHEIRSILP, B.; SUKSAROGUE, T. T.; BOURTOOMC, T. **Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids**. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 210 – 218, 2011.

SAITOU, N., NEI, M. **The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees**. *Molecular Biology and Evolution*, v.4, p. 406-425, 1987.

SAKAKI, H., NAKANISHI, T., SATONAKA, K., MIK, W., FUJITA, T., KOMEMUSHI, S. **Properties of a high-torularhodin-producing mutant of *Rhodotorula glutinis* cultivated under oxidative stress**. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 89, p. 203-205, 2000.

SCHERER, S.; STEVENS, D. A. **Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species**. *Journal of Clinical Microbiology*, 25. p. 675-679, 1987.

SCHMIDELL, W.; LIMA U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**, 1ª Edição. São Paulo: Edgard Blücher, 2001, v. 2, 106 p.

SCHNEIDER, T.; HONNINGER, S. G.; FRENCH, W.T.; HERNANDEZ, R.; MERKT, N.; CLAUPEIN, W.; HETRICK, M.; PHAM, P. **Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents**. *Energy*, p. 1 - 10, 2013.

SILVA, G.P., MACK, M., CONTIERO, J. **Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology**, *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 30–39, 2009.

SILVEIRA, A. A. B.; OKADA, K.; TAKAKI, G. M. C. **B-caroteno e Astaxantina – características e importância: uma revisão.** *Revista Eletrônica Interdisciplinar de Saúde e Educação - RISE*, v. 1, n. 1, 2014.

SQUINA F. M.; MERCADANTE, A. Z. **Análise, por CLAE, de carotenoides de cinco linhagens de *Rhodotorula*.** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.39, n. 3, p. 309-318, 2003.

TACCARI, M.; CANONICO, L.; COMITINI, F.; MANAZZU, I.; CIANI, M. **Screening of yeasts for growth on crude glycerol and optimization of biomass production.** *Bioresource Technology*, v. 110, p. 488 - 495, 2012.

TKÁCOVÁ, J.; FURDÍKOVÁ, K.; KLEMPOVÁ, T.; DURCANSKÁ, K.; CERTÍK, M. **Screening of carotenoid-producing *Rhodotorula* strains isolated from natural sources.** *Acta Chimica Slovaca*, v. 8, n. 1, p. 34 – 38, 2015.

TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M., KUMAR, S. **Mega 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0.** *Molecular Biology and Evolution*, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J., CLUSTAL, W. **Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice.** *Nucleic Acids Research*, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TRÊS, M. V.; FRANCHESCHI, E.; BORGES, G. R.; DARIVA, C.; CORAZZA, F.C.; OLIVEIRA, J. V.; M CORAZZA, M. L. **Influência da temperatura na solubilidade de  $\beta$ -caroteno em solventes orgânicos à pressão ambiente.** *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.27, n. 4, p. 737-743, 2007.

VALDUGA, E.; TATSCH, P.O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M. **Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais.** *Química Nova*, v. 32, p. 2429 - 2436, 2009.

VOAIDES, C.; DIMA, R. **The effect of nitrogen source on carotenoids production by *Rhodotorula* sp.** *Romanian Biotechnological Letters*, v. 17, n. 5, p. 7570-7576, 2012

WANG, X. Z.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B. A. **Glycerol production by microbial fermentation: a review.** *Biotechnology Advances*, v. 19, p. 201 – 223, 2001.

WANG, S. L.; SUN, J. S.; HAN, B. Z.; WU, X. Z. **Enhanced  $\beta$ -carotene production by *Rhodotorula glutinis* using high hydrostatic pressure.** *Korean J. Chem. Eng.*, v. 25, n. 3, p. 513 – 516, 2008.

UNGUREANU, C.; MARCHAL, L.; CHIRVASE, A. A.; FOUCAULT, A. **Centrifugal partition extraction, a new method for direct metabolites recovery from culture broth: Case study of torularhodin recovery from *Rhodotorula rubra*.** *Bioresource Technology*, v. 132, p. 406 – 409, 2013.

XU, J.; ZHAO, X.; WANG, W.; DU, W.; LIU, D. **Microbial conversion of biodiesel byproduct glycerol to triacylglycerols by oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and the individual effect of some impurities on lipid production.** *Biochemical Engineering Journal*, v.65, p. 30 – 36, 2012.

YEN, H. W.; ZHANG, Z. **Effects of dissolved oxygen level on cell growth and total lipid accumulation in the cultivation of *Rhodotorula glutinis*.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 112, n. 1, p. 71 – 74, 2011.

YEN, H.W.; YANG, Y.C. **The effects of irradiation and microfiltration on the cells growing and total lipids production in the cultivation of *Rhodotorula glutinis*.** *Bioresource Technology*, v. 107, p. 539 – 541, 2012.

YEN, H.W.; LIU, Y. X.; CHANG, J. S. **The effects of feeding criteria on the growth of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* in a pilot-scale airlift bioreactor.** *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, p. 1 - 5, 2014.

YOUNG, A. J.; LOWE, G. M. **Antioxidant and Prooxidant Properties of Carotenoids.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 385, n. 1, p. 20 - 27, 2001.

ZHANG, Z.; ZHANG, X.; TAN, T. **Lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* under irradiation/high-temperature and dark/low-temperature cultivation.** *Bioresource Technology*, v. 157, p. 149 – 153, 2014.

ZHU, L.Y; ZONG, M. H.; WU, H. **Efficient lipids production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation.** *Bioresource Technology*, v. 99, p. 7881–7785, 2008.

ZHOU, Y.; NIE, K.; ZHANG, X.; LIU, S.; WANG, M.; DENG, L.; WANG, F.; TAN, T. **Production of fumaric acid from biodiesel-derived crude glycerol by *Rhizopus arrhizus*.** *Bioresource Technology*, v.163, p. 48 – 53, 2014.

## ANEXO A

### Características Físico-Químicas do Glicerol Bruto cedido pela UBQ/Petrobrás

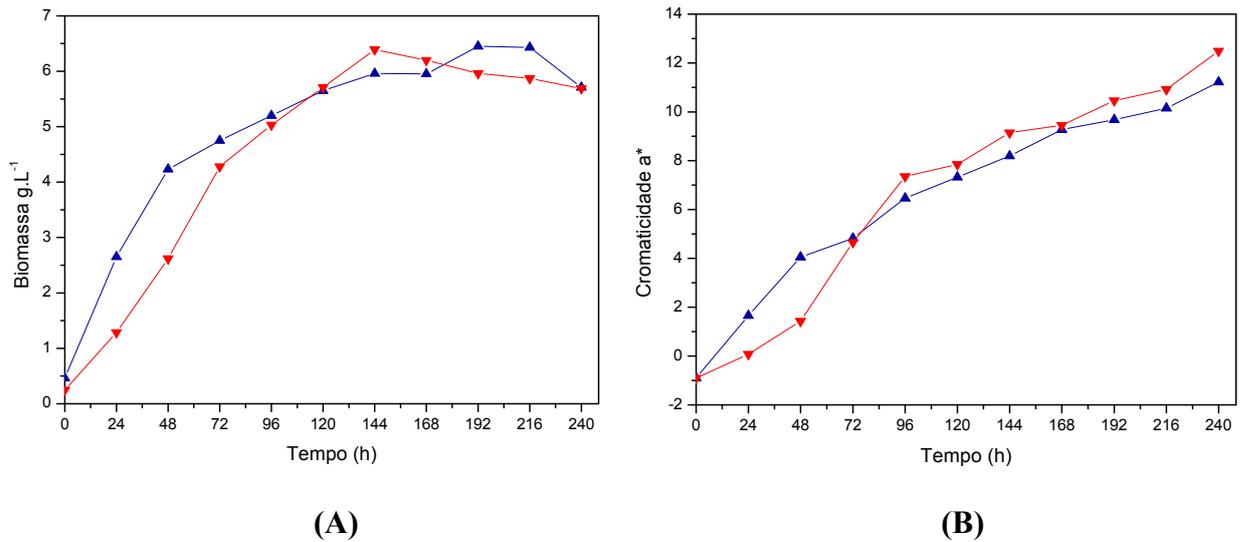
<b>Características</b>	<b>Método</b>	<b>Resultado</b>	<b>Unidade</b>
Metanol	EN 14110	0,365	% massa
Aspecto	Visual	LII <sup>(1)</sup>	traços
Cor	Visual	amarelo	traços
Densidade absoluta a 20 °C	D 4052	1260,3	kg/m <sup>3</sup>
Umidade	E 203	12,76	% m/m
Cinzas em glicerina	BIO 1000	4,9	% m/m
Glicerol em glicerina	BIO 1002	80,9	% m/m
Cloretos em glicerina	BIO 1001	3,88	% m/m
Determinação de Teor de MONG <sup>(2)</sup>	ISO 2464	1,44	%
pH	BIO 1012	5,5	traços

(1) LII: Límpido e isento de impurezas a 24°C (UBQ, 2010)

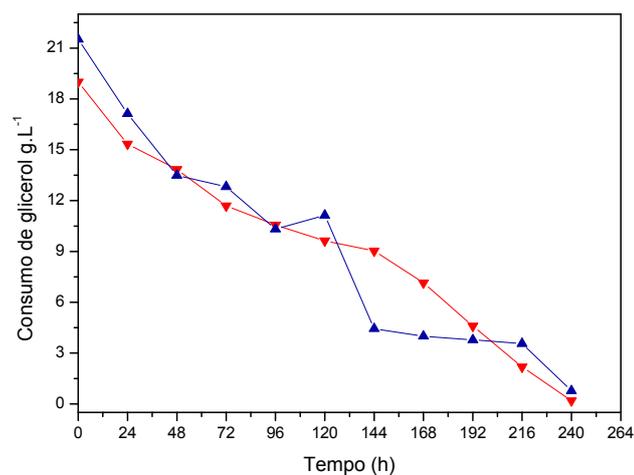
(2) MONG (matéria (orgânica) não glicerol) em glicerina

## ANEXO B

Teste de crescimento em Sabouraud original e Sabouraud modificado com *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 conduzido em Erlenmeyer de 2 L.



**Figura 30** – Produção de biomassa (A) e Cromaticidade  $a^*$  (B) por *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 em meio contendo Sabouraud original (▲) e Sabouraud modificado (▼) conduzido em Erlenmeyer de 2 L por 240 h, 30° C e 150 rpm



**Figura 31** – Consumo de glicerol por *Rhodotorula mucilaginosa* CMIAT 164 em meio contendo Sabouraud original (▲) e Sabouraud modificado (▼) conduzido em Erlenmeyer de 2 L por 240 h, 30° C e 150 rpm